

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
und der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin CVK
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen
vor und nach Nierentransplantation im ELISpot-Assay -
Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen und mit dem klinischen Ausgang**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Presber

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Prof. Dr. H.-D. Volk
2. Dr med. Manfred Lehmann
3. Dr. med Ulrich Sack

Datum der Promotion: 11. 07. 2005

Abstakt

Hintergrund: Um akute Rejektionen nach Nierentransplantation früh erkennen und behandeln zu können, gleichzeitig die Nebenwirkungen einer immunsuppressiven Therapie zu minimieren, wäre die Etablierung eines “Immunmonitorings”, welches zu jedem Zeitpunkt Hinweise auf die Aktivierung des Immunsystems des Empfängers gegen das Transplantat gibt, wünschenswert.

Methodik: In dieser Studie wurden die Anzahl der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden T-Zellen von 52 nierentransplantierten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten vor (prä-TX) und nach Transplantation (post-TX) im ELISpot-Assay gemessen und in Zusammenhang mit der klinischen Entwicklung gebracht. Außerdem wurde das Assay auf Reproduzierbarkeit untersucht und versucht zu optimieren.

Ergebnisse: Eine stark erhöhte Anzahl spenderreaktiver Zellen prä-TX (>200 IFN γ -spots/ $3 \cdot 10^5$ PBMZ, $n = 5$) war immer mit einer akuten Rejektion des Transplantats assoziiert. Post-TX korrelierte die Anzahl der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen mit der Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation. Diese Korrelation wurde in den Wochen 2 und 3 post-TX und bei Patienten ohne akute Rejektion, besonders deutlich. Hinsichtlich der methodischen Optimierung hat sich die magnetische Depletion CD2^{pos}-Zellen als effektiv gezeigt, die IFN γ -Sekretion von Stimulatorzellen zu unterbinden. Um die Reproduzierbarkeit des Assays zu verbessern sollten Stimulatorzellen im Überschuss und Empfänger-T-Zellen in einer konstanten Anzahl eingesetzt werden. Dabei sollte die Gesamtzellzahl über 10^6 Zellen/ml betragen.

Conclusion: Das ELISpot-Assay ist zur Erkennung klinisch relevanter T-Zellsensibilisierungen vor und nach Transplantation geeignet. Vor einem Einsatz in der klinischen Routine sollten jedoch einige methodische Verbesserungen vorgenommen werden.

Schlagwörter:

Nierentransplantation,

spenderspezifische T-Zellen,

ELISpot-Assay,

Interferon gamma

Abstract

Background: In order to perform early diagnosis and treatment of acute rejections after renal transplantation while minimizing side effects of immunosuppression, an immune monitoring tool is needed, which gives information on the activation state of the immune system of the transplant recipient against the allograft at any given time.

Methods: In this study, frequencies of donor-reactive, IFN γ -producing T cells were measured in 52 renal transplant recipients at different time points before (pre-TX) and after transplantation (post-TX) using the ELISPOT-assay. The frequencies were correlated with clinical outcome. Also, the reproducibility of the assay and possibilities of optimization were tested.

Results: Highly elevated frequencies of donor-reactive cells pre-TX (>200 IFN γ -spots/ 3×10^5 PBMC's, $n = 5$) were always associated with acute rejection episodes after transplantation. Post-TX frequencies of donor-reactive, IFN γ -producing cells correlated significantly with graft function one year post-TX. This correlation was strongest for frequencies in week 2 and 3 post-TX and in patients without acute rejection. Regarding the methodical optimization, magnetic CD2^{pos}-cell depletion of donor leucocytes proved useful to inhibit IFN γ secretion of stimulating cells. To improve reproducibility of the assay stimulating cells should be used as a surplus, a constant number of responding T cells should be chosen, and overall cell concentration should exceed 10^6 cells/ml.

Conclusion: The ELISPOT-assay is a useful tool to detect clinically relevant T cell sensitisation pre- and post-TX. Before it is routinely used some methodical alterations must be performed.

keywords:

renal transplantation,

donor-specific T cells,

elispot-assay,

interferon gamma

Inhaltsverzeichnis

Abstakt	3
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
Zusammenfassung	10
1 Einleitung	12
2 Theoretischer Hintergrund	15
2.1 Die akute Rejektion	15
Diagnose	15
Risikofaktoren	16
Therapie	16
Komplikationen	16
2.2 Die CTN- die chronische Transplantat-Nephropathie	17
Diagnose	17
Pathogenese	17
2.3 Der Tod des Patienten bei funktionsfähigem Transplantat	19
Kardiovaskuläre Erkrankungen	19
Tumore	20
Infektionen	20
2.4 Die Immunantwort	21
Bedeutung von T-Zellen	21
T-Zellaktivierung	22
Immunität gegen das Transplantat	23
Bedeutung von IFN γ	25
Gedächtniszellen und Effektorzellen	25

2.5 Das ELISpot-Assay - Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay	26
3 Aufgabenstellung	28
4 Methoden	30
Studiendesign	30
Zellpräparation	31
Zellzahlbestimmung	32
Kryokonservierung von Spenderzellen	33
ELISpot-Assay	34
CD2 ^{pos} Zelldepletion durch MACS - Magnetic Cell Sorting	38
Messung des Anteils der T-Zellen in PBMZ	39
Erfassung transplantationsspezifischer Daten	40
Statistische Analysen	41
5 Materialien	42
Patienten und Probanden	42
Verbrauchsmaterialien und wiederverwendbare Materialien	44
Geräte	45
Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien	46
Zellstimulantien und Antikörperkonjugate	49
Verwendete Software	49
6 Ergebnisse	50
6.1 Einige Patientenbeispiele im Verlauf	52
Patienten ohne Nachweis spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen	52
Patienten mit spenderreaktiven Zellen prä-Tx	52
Patienten mit spenderreaktiven Zellen post-Tx	55
Patienten, die eine OKT3-Induktionstherapie erhielten	56
6.2 Spenderreaktive, IFNγ-produzierende Zellen prä-Tx	60
Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen	60
Zusammenhang mit der Nierenfunktion	61
Zusammenhang mit Sensibilisierungsfaktoren	61
Zusammenhang zwischen spenderreaktiven Zellen prä- und post-Tx	62
6.3 Spenderreaktive, IFNγ-produzierende Zellen post-Tx	63
Zusammenhang mit der Nierenfunktion	63
Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen	66
Zusammenhang mit Sensibilisierungsfaktoren	68

6.4 Besonderheiten immunsuppressiver Therapieschemata	70
Patienten, die mit FTY720 behandelt wurden	70
Patienten, die eine OKT3-Induktionstherapie erhielten	71
Patienten, die eine Lebendspende erhielten	72
6.5 Versuch der Optimierung des ELISpot-Assays	73
Reproduzierbarkeit	73
Ciclosporin A	74
Tacrolimus	75
CD2 ^{pos} -Zelldepletion	76
Bestrahlung	77
Anteil der T-Zellen an Responder-PBMZ	78
Optimale Zellkonzentrationen	79
7 Diskussion	82
7.1 Bewertung der angewandten Methodik	82
Bestimmung spenderreaktiver Zellen in PBMZ	82
Stellenwert des ELISpot-Assays	83
Versuch der Optimierung des Assays	84
Einschränkung der Interpretation der Werte	87
7.2 Immunologische Interpretation	88
Allgemeine Interpretation der gemessenen Zellen	88
Subklinische Rejektion	90
Direkte versus indirekte Präsentation	91
T1/T2-Polarisation	93
CD4 ^{pos} -/CD8 ^{pos} T-Zellen	95
Regulatorisches IFN γ ?	96
7.3 Klinische Relevanz der Ergebnisse	98
Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen prä-Tx	98
Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen post-Tx	100
8 Literaturverzeichnis	104
9 Anhang	116
Danksagung	116
Eidesstattliche Erklärung	117
Lebenslauf	118

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Studiendesign	31
Abb. 2 Schema zum Mechanismus des ELISpot-Assays	34
Abb. 3 Kamerablick auf IFN γ -Spots spenderreaktiver Zellen im ELISpot-Assay	35
Abb. 4 Patienten ohne spenderreaktive, IFN γ -produzierender Zellen prä- und post-Tx	53
Abb. 5 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen prä-Tx	54
Abb. 6 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen prä-Tx (2)	55
Abb. 7 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen post-Tx	57
Abb. 8 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen post-Tx (2)	58
Abb. 9 Patienten mit OKT3-Induktionsschema	59
Abb. 10 Spenderreaktive Zellen prä-Tx bei Patienten mit und ohne frühe aRx	60
Abb. 11 Spenderreaktive Zellen prä-Tx bei Patienten mit und ohne PRA prä-Tx	62
Abb. 12 Nierenfunktion ein Jahr post-Tx	65
Abb. 13 Nierenfunktion ein Jahr post-Tx bei Patienten ohne aRx	67
Abb. 14 Spenderreaktive Zellen post-Tx und Nierenfunktion bei Patienten mit und ohne aRx	68
Abb. 15 Hämodialysedauer und spenderreaktive Zellen post-Tx	69
Abb. 16 HLA-Gesamt-Mismatch und spenderreaktive Zellen in Woche 2 post-Tx	70
Abb. 17 Max. spenderreaktive Zellen post-Tx bei Patienten mit Lebend- und Kadaverspenden	73
Abb. 18 IFN γ -Sekretion CMV-spezifischer T-Zellen nach Einwirkung von Ciclosporin A	74
Abb. 19 IFN γ -Sekretion CMV-spezifischer T-Zellen nach Einwirkung von Tacrolimus	75
Abb. 20 Übertragung von Tacrolimus auf unbehandelte CMV-spezifische T-Zellen	75
Abb. 21 IFN γ -Sekretion von CD2-depletierten Leukozyten unter PHA-Stimulation	76
Abb. 22 Aktivierung alloreaktiver T-Zellen durch CD2-depletierte allogene Leukozyten	77
Abb. 23 IFN γ -Sekretion (nach allogenem Stimulus) und Allogenität bestrahlter Leukozyten	78
Abb. 24 Anteil von T-Zellen an PBMZ zu verschiedenen Zeitpunkten prä- und post-Tx	79
Abb. 25 IFN γ -Spots im Zusammenhang mit der Anzahl der Stimulator- und der Responderzellen	80
Abb. 26 Die alloreaktive T-Zell-Antwort konvergiert bei einer sättigenden Stimulation	80
Tab. 1 Charakterisika der untersuchten Patienten	43
Tab. 2 Extremwerte und Mediane aller Messwerte	50
Tab. 3 Sensibilisierung und Transplantationsverlauf der Patienten mit > 200 IFN γ -Spots prä-Tx	61
Tab. 4 Korrelation: spenderreaktive Zellen post-Tx und Nierenfunktion	64
Tab. 5 Korrelation: spenderreaktive Zellen post-Tx und Nierenfunktion bei Patienten ohne aRx	66
Tab. 6 Sensibilisierung und Transplantationsverlauf der Patienten mit FTY720	71
Tab. 7 Sensibilisierung und Transplantationsverlauf der Patienten mit OKT3-Induktion	72
Tab. 8 Sensibilisierung und Transplantationsverlauf der Patienten mit einer Lebensspende	73

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin	M	Monat
aRx	akute Rejektion	MP	Methylprednisolon
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin	mRNA	messenger ribonucleid acid
CD	cluster of differentiation	n	Anzahl, nein
CMV	Cytomegalie-Virus	neg.	seronegativ (z.B. CMV)
Con A	Concavalin A	NK-	natürliche Killerzellen
CTN	chronische Transplantat-Nephropathie	o.A.	ohne Angaben
D+/-	Spender ist positiv/ negativ	p	Wahrscheinlichkeit, dass der statistische Zusammenhang zufällig ist
DMSO	Dimethylsulfoxid	P1	Proband 1
EBV	Ebstein-Barr-Virus	PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
ELISpot	enzyme-linked immunosorbent spot	PBMZ	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
et al.	et alumni = und Mitarbeiter	PBS	phosphate buffered saline
FKS	fetales Kälberserum	PCR	polymerase chain reaction
GFR	glomeruläre Filtrationsrate	SSP/SSO	sequent specific primers / oligonucleotide probes
HLA	human leukocyte antigen = humanes MHC-Molekül	PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
HZV	Herpes-Zoster-Virus	PHA	Phytohemagglutinin
IFN γ	Interferon gamma	pos.	positiv
j	ja	post-Tx	nach der Transplantation
J	Jahr	pp65	Phosphoprotein 65 HCMV
IL2	Interleukin 2	PRA	panelreaktive Antikörper in %
KHK	koronare Herzkrankheit	prä-Tx	vor der Transplantation
LDA	limiting dilution assay	R+/-	Empfänger ist positiv/ negativ
mM	Millimol	r _s	Spearman'scher Korrelationskoeffizient
mAk	monoklonaler Antikörper	SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
MACS	magnetic activated cell sorting	T	Tag
MDRD	modification of diet in renal disease	TNF α	Tumornekrosefaktor α
MHC	major histocompatibility complex	TGF β	transforming growth faktor β
mittl.	mittlerer	Tx	Transplantation
MLR	mixed lymphocyte reaction	W	Woche
MMF	Mycophenolat Mofetil	VZV	Varizella-Zoster-Virus

Zusammenfassung

Für den Erfolg einer Nierentransplantation ist es wichtig, Risikofaktoren für eine immunologische Schädigung des Organs vor der Transplantation zu minimieren und akute Rejektionen nach Transplantation früh zu diagnostizieren und zu therapieren um einen Transplantatverlust oder die Entwicklung einer chronischen Transplantat-Nephropathie (CTN) zu verhindern. Ebenso erstrebenswert ist eine individuelle Therapieanpassung, welche die Nebenwirkungen der medikamentösen Immunsuppression auf ein Minimum reduziert. Die Etablierung eines „Immunmonitorings“, welches zu jedem Zeitpunkt Hinweise auf die momentane Aktivierung des Immunsystems des Empfängers gegen das Transplantat gibt, und zwar sowohl vor wie nach der Transplantation, bedeutet eine Annäherung an diese Ziele.

Da T-Zellen eine zentrale Rolle bei der akuten Transplantatrejektion spielen und $\text{IFN}\gamma$, welches von aktivierten T-Zellen sezerniert wird, ebenfalls in Zusammenhang mit akuten und chronischen Rejektionen gebracht wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Anzahl spenderreaktiver, $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen aus dem peripheren Blut nierentransplanterter Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und mit den klinischen Verläufen verglichen. Dazu wurden 52 Patienten direkt vor Transplantation sowie wöchentlich innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation 20 ml Zitratblut abgenommen und die daraus präparierten mononukleären Zellen (PBMZ) mit Spenderleukozyten für 24 h im Verhältnis 1:1 im ELISpot-Assay stimuliert. Das ELISpot-Assay ist eine von Heeger et al. für diese Fragestellung adaptierte Technik, in der $\text{IFN}\gamma$ direkt neben der sezernierenden T-Zelle durch Antikörper an eine Membran gebunden und über eine enzymatische Reaktion als farbiger „Spot“ sichtbar wird [1]. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung wurde das Assay auf Reproduzierbarkeit überprüft und versucht zu optimieren. Dabei standen die eingesetzte Zellkonzentration und die Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion durch Spenderzellen im Vordergrund, wobei der Einfluss von Bestrahlung, Calcineurininhibitoren und T-Zell-Depletion untersucht wurde.

Es ergab sich für die Werte vor Transplantation ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit früher akuter Rejektion und Patienten ohne Rejektion. Stark erhöhte Frequenzen ($>200 \text{ IFN}\gamma\text{-Spots}/3 \cdot 10^5 \text{ Empfänger-PBMZ}$, $n = 5$) waren immer mit einer akuten Rejektion assoziiert. Bei Messwerten unter 200 Spots vor Transplantation wurde jedoch keine klare Assoziation zu frühen akuten Rejektionen beobachtet. Nach Transplantation konnte kein

statistischer Unterschied der Messwerte zwischen Patienten mit früher akuter Rejektion und Patienten ohne Rejektion ihres Organs gezeigt werden. Dahingegen korrelierte die Anzahl der nach Transplantation gemessenen IFN γ -produzierenden Zellen mit der Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation, welche ihrerseits einen prognostischen Marker für die Langzeitfunktion des Transplantats darstellt [2]. Diese Korrelation wurde für die Messwerte in Woche 2 und 3 sowie innerhalb der Gruppe der Patienten ohne akute Rejektion besonders deutlich. Daher handelt es sich bei einem erhöhten Wert innerhalb dieses Zeitraums um einen vom Auftreten akuter Rejektionen unabhängigen Risikofaktor für eine schlechtere Langzeitprognose des Spenderorgans. Die Anzahl spenderreaktiver Zellen nach Transplantation korrelierte außerdem mit dem HLA-Mismatch und war für Empfänger von Kadaverspenden sowie Patienten mit langer Hämodialysedauer (min. 79 Monate) signifikant höher als für Empfänger einer Lebendspende bzw. Patienten mit kurzer Hämodialysedauer. Hinsichtlich der methodischen Optimierung des Assays erwies sich die magnetische CD2^{pos}-Zelldepletion der Spenderleukozyten, mit der T-Zellen und NK-Zellen aus den stimulierenden Zellen entfernt werden, als effektiv, die IFN γ -Sekretion der Spenderzellen zu unterbinden. Der Einsatz von stimulierenden Zellen im Überschuss, die Einstellung der Empfänger-PBMZ auf eine konstante Anzahl von T-Zellen sowie eine Zellkonzentration von über 10⁶/ml im Assay könnten in Zukunft ebenfalls die Reproduzierbarkeit und Reliabilität des Assays verbessern, dessen Variationskoeffizient bis über 0,4 betrug.

Mit Hilfe des ELISpot-Assays scheint es möglich, sowohl eine klinisch relevante T-Zell-Sensibilisierung vor einer Transplantation zu erkennen als auch Patienten mit einem Risiko für eine immunologisch vermittelte Funktionseinschränkung des Transplantats zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation zu identifizieren. Vor Einsatz in der klinischen Routine muss jedoch die Methodik noch weiter verbessert werden, um die klinische Relevanz zu sichern.

1 Einleitung

Bei etwa 170 Patienten von einer Million Einwohner Deutschlands wird jährlich eine chronische Niereninsuffizienz neu diagnostiziert [3]. Unter Niereninsuffizienz versteht man eine nicht ausreichende oder völlig ausgefallene Nierenfunktion. Es handelt sich dabei um einen meist langsam fortschreitenden Verlust von funktionsfähigem Nierengewebe, der in der Folge zu einer Abnahme des Glomerulumfiltrates führt und in der Regel als Folgeschaden verschiedener zugrunde liegender chronischer Krankheiten auftritt:

- Diabetische Nephropathie (ca. 36 %)
- Chronische Glomerulonephritis (ca. 14 %)
- Interstitielle Nephritis und chronische Pyelonephritis (ca. 9 %)
- Hypertone vaskuläre Nephropathie (ca. 18 %)
- Polyzystische Nephropathie (ca. 5 %)
- Systemerkrankungen wie z.B. Vaskulitiden oder Syst. Lupus Erythematoses (ca. 4 %)
- hereditäre/ kongenitale Niereninsuffizienz (ca. 1 %)
- Analgetikanephropathie und sonstige Ursachen (ca. 4 %)
- nicht klassifizierte Ursachen (ca. 9 %)

(Diagnoseverteilung bei Inzidenz und Aufnahme in eine Nierenersatztherapie 2002 [3])

Im fortgeschrittenen Stadium der Niereninsuffizienz kommt es zu einer Hypertonie und aufgrund der mangelnden Flüssigkeitsausscheidung zu Lungenödemen, Pleura- bzw. Perikardergüssen sowie zur Neigung zu peripheren Ödemen. Als Folge verminderter Hormonfreisetzung treten Knochenveränderungen und Blutbildveränderungen wie die sogenannte renale Anämie auf. Durch die Ansammlung von nicht ausgeschiedenen harnpflichtigen Substanzen im Blut werden Beschwerden im Magen-Darm-Trakt wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe sowie weitere typische Symptome wie Juckreiz, Wadenkrämpfe und der Geruch der Betroffenen nach Urin, der sogenannte Foetor uraemicus, hervorgerufen. Es kann auch zu neurologischen Symptomen wie Sensibilitätsstörungen, Konzentrationsschwäche, Verwirrtheit bis hin zur Bewusstlosigkeit und zum urämischen Koma kommen. Bei einem vollständigen Funktionsausfall der Nierenglomeruli spricht man von terminalem Nierenversagen, das ohne Maßnahmen innerhalb relativ kurzer Zeit zum Tod führt. Lebensrettend ist dann lediglich die Dialyse oder die Transplantation einer Spenderniere.

Bei dem in Deutschland überwiegend praktizierten Hämodialyseverfahren wird das Blut des Patienten drei-viermal wöchentlich für vier bis acht Stunden über einen Katheter von harnpflichtigen Substanzen gereinigt. Daneben gibt es noch die Möglichkeit der meist täglichen Peritonealdialyse, bei der die harnpflichtigen Substanzen über das als semipermeable Membran genutzte Peritoneum in eine in den Bauchraum geleitete Dialyselösung diffundieren. Neben dem enormen Zeitaufwand beklagen Dialysepatienten vor allem die körperliche Anstrengung und Einschränkung. Eine Nierentransplantation führt dagegen zu einer wesentlich besseren Lebensqualität.

Die erste Nierentransplantation am Menschen wurde im November 1911 in Philadelphia, USA durchgeführt. Allerdings nahm das Transplantat seine Funktion nicht auf. Neben technischen Problemen verhinderte vor allem das Unwissen über immunologische Zusammenhänge den Erfolg der Transplantation. Erst im Jahre 1947 gelang der Durchbruch, als einer Patientin mit akutem Nierenversagen eine Niere extrakorporal am Arm transplantiert wurde. Die Niere arbeitete einige Tage - die Patientin überlebte [4].

In Deutschland wurden seit 1963 fast 50000 Nierentransplantationen durchgeführt, 2346 davon allein im Jahr 2001. Dabei wurde durch kontinuierliche Verbesserung immunsuppressiver Medikamente, die das transplantierte Organ vor immunologischen Angriffen des Organempfängers schützen sollen, eine stetige Verlängerung des Transplantatüberlebens erreicht. Während in den 60er Jahren 80 % der Lebendspenden und nur 50 % der Kadaverspenden ein Jahr nach Transplantation noch ausreichende Funktion zeigten [4], lag die 1-Jahres-Transplantatüberlebensrate bei Patienten, die im Jahr 2002 in Deutschland transplantiert wurden für Lebendspenden bei 94 % und für Kadaverspenden bei 82 % [5]. Dies wurde einerseits durch besseres perioperatives Management, andererseits vor allem durch die Einführung von Ciclosporin A in den 80er Jahren erreicht, aber auch durch weitere Substanzen wie Antilymphozyten-Antikörper (OKT3, ATG), Tacrolimus, IL2-Rezeptorantagonisten, Mycophenolat Mofetil, oder Sirolimus, die Eingang in die immunsuppressive Therapie fanden. Heutzutage werden mehrere Substanzen miteinander kombiniert, um den immunsuppressiven Effekt optimal und die Nebenwirkungen der einzelnen Substanzen minimal zu gestalten, wobei meist eine Kombination aus Kortikosteroiden mit einem Calcineurininhibitor (Ciclosporin A oder Tacrolimus) in Verbindung mit einer oder mehreren weiteren Substanzen bevorzugt wird. Andere Kombinationen oder neue immunsuppressive Medikamente wie FTY720 [6] oder Campath 1H [7] werden derzeit in Studien getestet.

Trotz der Erfolge, die in den letzten Jahren vor allem kurzfristig zu verzeichnen sind, sind die Langzeitergebnisse der Nierentransplantation nach wie vor unbefriedigend. Nach zehn Jahren arbeiten nur noch etwa 55 % der Lebendspenden und nicht mal 40 % der Kadaverspenden [8].

Im besonderen Blickpunkt des Interesses stehen daher unter anderem folgende Faktoren, die wesentlich für den eingeschränkten Erfolg der Nierentransplantation sein können:

- das Auftreten einer akuten Rejektion,
- das Auftreten einer chronischen Transplantat-Nephropathie,
- der Tod des Patienten bei funktionsfähigem Transplantat, vor allem aufgrund der Nebenwirkungen der Langzeitimmunsuppression.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Die akute Rejektion

Die meisten der akuten Rejektionsepisoden finden innerhalb der ersten Tage bis Wochen nach Transplantation statt, können aber prinzipiell auch noch Jahre später auftreten. Dabei entwickelt sich eine immunologische Reaktion des Empfängers gegen das Transplantat, die mit einem interstitiellen Ödem und einer Schädigung von Gefäßen und parenchymatösen Strukturen einhergeht und innerhalb weniger Tage zu einer zunehmenden Funktionseinschränkung des Organs führt, die man anhand des Anstiegs des Serumkreatininspiegels messen kann. Je nach klinischem Zentrum wird ein Anstieg des Serumkreatinins um 10-20 % von der „Baseline“ - dem durchschnittlich niedrigsten Wert - nach Transplantation als verdächtig angesehen [9, 10]. Fakultative klinische Zeichen wie Fieber und schmerzhafte Schwellungen des Transplantats sind seit der Einführung der modernen immunsuppressiven Medikamente nur noch teilweise zu beobachten [11].

Diagnose

Diagnostiziert wird die akute Rejektion durch die histologische Untersuchung eines Transplantatbiopsats. Bei positivem Befund findet sich eine zunehmende Infiltration des Transplantats vor allem durch mononukleäre Zellen des Transplantatempfängers wie T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Makrophagen, aber auch Granulozyten, wobei im Vollbild einer akuten Rejektion die unspezifischen Zellen überwiegen. Mit Hilfe der Kriterien der „Banff-Klassifikationen“ werden die akuten Rejektionen in verschiedene Typen unterteilt, die sowohl von prognostischer als auch von therapeutischer Bedeutung sind. Maßgebend dabei ist eine Invasion der Nierentubuli und/oder Gefäße durch inflammatorische Zellen. Die „Banff-Klassifikation“ von 1997 unterscheidet vier Typen anhand der Anzahl und der Lokalisation der infiltrierenden Zellen: 1. eine „Borderline“ Kategorie („borderline changes“), gekennzeichnet durch eine milde Tubulitis und/oder milde fokale interstitielle Entzündung; 2. eine tubulointerstitielle Rejektion (Typ I), Ia mit fokaler moderater Tubulitis, Ib mit schwerer Tubulitis; 3. eine vaskuläre Rejektion (Typ II) mit intimaler Arteriitis, wobei weiter in IIa mit milder bis moderater intimaler Arteriitis und IIb mit schwerer intimaler Arteriitis unterteilt wird;

und 4. eine schwere Rejektion (Typ III) mit transmuraler Arteriitis, fokalen Infarkten und Einblutungen [12].

Risikofaktoren

Unterschiede im Histokompatibilitätssystem der HLA-Moleküle zwischen Spender und Empfänger sowie die Präsensibilisierung des Empfängers mit präformierten Anti-HLA-Antikörpern im Serum schon vor Transplantation (prä-Tx) erhöhen die Wahrscheinlichkeit für eine akute Rejektion [13, 14].

Therapie

Eine akute Rejektion wird zumeist mit einer Hochdosis Kortikosteroide behandelt. Bei schweren akuten Rejektionen mit vaskulärer Beteiligung, die schlechter zu therapieren sind, oder bei Nichtansprechen auf Kortikosteroide können Antilymphozyten-Antikörper wie OKT3 die Rejektion beherrschbar machen. Wenn bei Verdacht auf eine akute Rejektion eine gerinnungshemmende Medikation eine Biopsie des Transplantats wegen möglicher verstärkter Blutungskomplikationen unmöglich macht, kann eine kalkulierte Gabe hochdosierter Kortikosteroide erfolgen. Ein Abfall des Serumkreatinins gibt dann einen Hinweis auf eine tatsächlich stattgefundene, therapierte akute Rejektion.

Komplikationen

Obwohl akute Rejektionen des Transplantats durch die Verwendung von neueren Immunsuppressiva generell seltener auftreten als früher (seit Einführung von Sirolimus, MMF und anti-IL2R-mAk etwa 30 %) und zum großen Teil behandelt werden können, so bleibt doch ein kleiner Teil resistent gegenüber den Therapiestrategien und führt zum Versagen der Organfunktion. Während frühe akute Rejektionen innerhalb der ersten sechs Monate noch zu über 90 % auf eine Therapie ansprechen, liegen die Erfolgchancen bei späten akuten Rejektionen nur noch bei 55-75 %. Das Auftreten einer akuten Rejektion, besonders in der Spätphase nach Transplantation, erhöht das Risiko für eine chronische Transplantatschädigung. Auch bei Patienten mit nur einer akuten Rejektionsepisode liegt die Wahrscheinlichkeit, dass das Organ ein Jahr nach Transplantation noch eine ausreichende Funktion besitzt, 15-25 % niedriger als bei Patienten ohne Rejektionsepisode [13].

Protokollbiopsien haben gezeigt, dass ein nicht unerheblicher Teil von etwa 30 % der Nierentransplantatempfänger mit stabiler Organfunktion innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation (post-Tx) inflammatorische Veränderungen im Transplantat aufweist, die den Kriterien einer akuten Rejektion Typ I nach Banff entsprechen [9]. Patienten mit unbehandelten sogenannten „subklinischen“ akuten Rejektionen innerhalb der ersten drei Monate post-Tx haben eine erhöhte Inzidenz von frühen (Monat 2 bis 3 nach Transplantation) und späten (Monat 7 bis 12 nach Transplantation) „klinischen“ akuten Rejektionen und eine schlechtere Nierenfunktion gemessen an einem höheren Serumkreatininwert nach zwei Jahren im Vergleich zu Patienten mit behandelten „subklinischen“ akuten Rejektionen [9, 15].

2.2 Die CTN- die chronische Transplantat-Nephropathie

Die chronische Transplantat-Nephropathie (CTN) ist der Hauptgrund für die Beschränkung der Langzeitfunktion der Nierentransplantate auf durchschnittlich zehn Jahre und für die Rückkehr zur Dialyse nach Transplantation [16].

Diagnose

Die CTN wird durch eine Funktionseinschränkung des Nierentransplantats mit erniedrigter glomerulärer Filtrationsrate und das unspezifische histologische Erscheinungsbild einer interstitiellen Fibrose, einer tubulären Atrophie und einer arteriellen Intimahyperplasie im Transplantatbiopsat charakterisiert und tritt frühestens drei Monate nach Transplantation auf [12]. Ähnlich wie die akute Rejektion wird sie anhand der „Banff-Klassifikation“ in drei Schweregrade unterteilt.

Pathogenese

Für die Entstehung einer CTN spielen mehrere immunologische und nichtimmunologische Faktoren eine Rolle.

Nichtimmunologische Faktoren: Chronische Einflüsse des Alters und der Erkrankungen des Spenders wie Bluthochdruck, Dyslipidämie und Diabetes mellitus können die Gewebestruktur der Niere so verändern, dass sie schon vor Transplantation histologische Veränderungen aufweist, die einer CTN ähnlich sind. Die Entwicklung einer CTN nach Transplantation ist dann wahrscheinlich [16]. Schädigungen des Transplantats im direkten Zusammenhang mit dem Transplantationsprozess (Bedeutung der Todesursache des Spenders [17, 18], der Art und Weise

der Organentnahme, der Organaufbewahrung und der Implantation und Reperfusion), die zu verzögerter Aufnahme der Transplantatfunktion führen können, sind stark negativ mit der Langzeitfunktion des Transplantats korreliert. Ebenso führen Erkrankungen wie Bluthochdruck [19, 20], Hypertriglycerinämie [21] und Diabetes mellitus des Empfängers zu Transplantatveränderungen im Sinne einer CTN. Die Größe des transplantierten Organs, das Geschlecht des Spenders und des Empfängers, Infektionen des Transplantats (z.B. CMV), eine wiederkehrende Grunderkrankung der Niere, sowie Nephrotoxizität der verwendeten Immunsuppressiva Ciclosporin A und Tacrolimus haben ebenfalls Einfluss auf die Langzeitfunktion des Organs; der direkte Zusammenhang mit der Entstehung einer CTN ist jedoch nicht vollständig geklärt [16].

Immunologische Faktoren: Ein wichtiger immunologischer Faktor, der die Entwicklung einer CTN stark begünstigt, ist das Auftreten von akuten Rejektionen, besonders zu einem späten Zeitpunkt nach Transplantation oder wenn sie schwer, wiederkehrend und schlecht therapierbar sind [22, 23]. Ebenso scheinen subklinische akute Rejektionen einen negativen Einfluss auf die Langzeitfunktion des Organs zu haben, falls sie nicht therapiert werden, wie schon weiter oben erwähnt von Rush et al. beobachtet wurde. Unterschiede im Histokompatibilitätssystem zwischen Spender und Empfänger sowie die Präsensibilisierung des Empfängers mit präformierten Anti-HLA-Antikörpern im Serum (PRA) schon vor der Transplantation sind mit schlechterer Prognose für die Langzeitfunktion des Transplantats verbunden [24, 25], ebenso eine schlechte Wirksamkeit und Noncompliance bezüglich der Immunsuppressiva. Bei einigen Patienten konnte nach Transplantation im Labor aber auch eine ständige spenderspezifische Immunreaktion nachgewiesen werden, die mit einem Fortschreiten einer CTN assoziiert war [26, 27].

Die immunologischen und nichtimmunologischen Faktoren beeinflussen sich gegenseitig. So können Verletzungen und Schäden des Transplantatgewebes zu einer unspezifischen Entzündung führen, die durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, erhöhter Expression von HLA-Molekülen auf Epithelien und Endothelien und einer Rekrutierung von antigenpräsentierenden Zellen ihrerseits mit einer Aktivierung der spezifischen Immunantwort gegen das Transplantat einhergeht [28, 29]. Es konnte daher auch gezeigt werden, dass Nierentransplantate mit verzögerter Funktion nach Peritransplantationsstress häufiger akute Rejektionen durchlitten, wobei dann die Prognose bezüglich ihrer Langzeitfunktion besonders schlecht war [30]. Auf der anderen Seite kann eine verzögerte Funktionsaufnahme der transplantierten Niere auch durch eine frühe akute Rejektion bedingt sein.

Das Zusammenspiel der immunologischen und nichtimmunologischen Faktoren führt zu einer chronischen Schädigung des Nierengewebes, die zu einem langfristigen fibrosierenden Umbau mit dem histologischen Bild der CTN und zu einer Funktionseinschränkung des Organs führen kann, welche irreversibel und nicht therapierbar sind.

2.3 Der Tod des Patienten bei funktionsfähigem Transplantat

Die Mortalität der Patienten nach Transplantation trotz funktionsfähigem Transplantat ist eine der Hauptkomplikationen, die bis heute den Erfolg von Nierentransplantationen limitieren. Dabei stehen die meisten Gründe für den Tod des Patienten in mehr oder weniger direktem Zusammenhang mit der Immunsuppression selbst.

Kardiovaskuläre Erkrankungen

Besonders Kortikosteroide und Tacrolimus, aber auch Ciclosporin A und führen zu einer Hyperglykämie, die in bis zu 20 % der Fälle einen Diabetes mellitus schon innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation auslösen kann [31], sowie zu einer Hypertonie, die bei bis zu 80 % aller nierentransplantierten Patienten behandlungsbedürftig ist [32]. Eine Hyperlipidämie, wie sie in 60-80 % [33] der Patienten nach Transplantation beobachtet wird, ist neben familiären und anamnestischen Faktoren einer immunsuppressiven Behandlung besonders mit Sirolimus [34], Kortikosteroiden und Ciclosporin A zuzuordnen. Die erhöhte Inzidenz von Anämie und Osteoporose nach Nierentransplantation ist ebenfalls zum Teil auf Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikamente zurückzuführen [35, 36]. Diese metabolischen Nebenwirkungen können zu kardiovaskulären Störungen führen, die einerseits neben der direkten nephrotoxischen Wirkung der Calcineurininhibitoren Ciclosporin A und Tacrolimus zu einer Schädigung des Transplantats mit schweren Folgen für die Langzeitfunktion [37, 38] beitragen, andererseits die Hauptursachen für den Tod des Patienten nach Nierentransplantation darstellen [39]. Etwa ein Viertel aller Patienten entwickelt nach Transplantation eine KHK mit der möglichen Folge eines Myokardinfarktes und etwa 15 % der Patienten leiden unter peripher vaskulären Störungen mit der möglichen Folge von cerebralen Insulten oder der Ausbildung einer PAVK [40].

Tumore

Ein weiteres Problem stellt die erhöhte Inzidenz maligner Neubildungen bei nierentransplantierten Patienten unter immunsuppressiver Therapie dar. Während das Risiko für nierentransplantierte Patienten an einem Tumor zu erkranken insgesamt drei-viermal höher liegt als in der Allgemeinbevölkerung [41], kann es für bestimmte Tumoren über 100-mal erhöht sein [42]. Dabei kommt es neben der Entwicklung von Hauttumoren (bis zu 37 % aller Transplantierten), Zervixkarzinomen, hepatobiliären Karzinomen, Nierenzellkarzinomen und Sarkomen (inklusive dem Kaposi Sarkom) vor allem zu lymphoproliferativen Erkrankungen [43], wobei der Anteil von Non-Hodgkin-Lymphomen 93 % beträgt. Pathogenetisch spielt bei letzterem die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus eine große Rolle. Die Prognose ist mit einer Letalität von 40 % innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung äußerst schlecht [44, 45]. Bestimmte Tumore wie z.B. einige Lymphome oder das Kaposi Sarkom sprechen auf eine Unterbrechung der Immunsuppression an [41]. Dadurch steigt jedoch wiederum das Risiko für eine akute Rejektion des Nierentransplantats.

Infektionen

Neben dem Effekt, die spezifische Abwehr des Transplantatempfängers so zu schwächen, dass zwar das Transplantat so gut wie möglich vor immunologischen Reaktionen geschützt wird, aber auch gefährliche Neuinfektionen durch vor allem opportunistische Erreger oder Reaktivierungen bestimmter Virusinfektionen im Körper begünstigt werden, hemmen Immunsuppressiva auch die unspezifischen Abwehrmechanismen des Patienten. Daher ist die rechtzeitige Diagnose von ablaufenden Infektionen bei Transplantationspatienten ohne die sonst wegweisenden Symptome wie Fieber, Schmerzen und Schwellungen eine schwierige Aufgabe. Während zu Beginn der Transplantationsära bei bis zu 70 % aller Nierentransplantierten schwerwiegende infektiöse Komplikationen auftraten, die bei 11-40 % der Patienten tödlich endeten, beträgt die durch Infektionen bedingte Mortalität nach Nierentransplantation heutzutage weniger als 5 %. Das wurde vor allem durch veränderte chirurgische Techniken, verbesserte Immunsuppressiva und die Einführung prophylaktischer antimikrobieller Substanzen erreicht [46]. Infektionen bleiben jedoch eine der Hauptursachen für den Tod des Patienten nach Nierentransplantation. Dabei spielen in erster Linie Bakterien wie Listerien, Nocardien und Legionellen, Pilze wie Candida, Aspergillus und Cryptococcus, und Protozoen wie Pneumocystis Carinii und Toxoplasma gondii eine große Rolle. Hauptsächlich entwickeln die Patienten Pneumonien, gefolgt von Pyelonephritiden, die in schweren Fällen zu einer Sepsis führen können. Herpesviren wie CMV, EBV, HZV und VZV und Papovaviren stellen aufgrund

der großen Durchseuchung der Bevölkerung ein besonderes Problem dar. Sowohl eine Primärinfektion als auch eine Virus-Reaktivierung sind dabei von Bedeutung [47]. So kann sich eine CMV-Infektion klinisch unter vielem anderen als Enzephalitis, Meningitis, Hepatitis, Enteritis, Myokarditis oder Pneumonie manifestieren, aber auch unter dem Bild einer Myelosuppression durch eine zusätzliche Verminderung der Immunität des Patienten weiteren opportunistischen Erregern Vorschub leisten [48]. Sowohl CMV als auch EBV sind mit lymphoproliferativen Erkrankungen assoziiert, ebenso wie das Papillomavirus aus der Gruppe der Papovaviren mit der Entwicklung eines Zervixkarzinoms [44].

Die möglichen Folgen einer immunologischen Reaktion gegen das Transplantat wie die akute Rejektion und die CTN stehen in direkter Konkurrenz zu den Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikamente, die genau diese immunologischen Reaktionen unterdrücken sollen. Während Patienten, die eine oder mehrere akute Rejektionen erleiden, von einem Schutz ihres Transplantats durch eine Erhöhung der Immunsuppression profitieren könnten [9, 49], tolerieren andere Patienten eine niedrigere Dosierung der Immunsuppression oder den vollständigen Verzicht auf ein bestimmtes Immunsuppressivum (z.B. Steroide oder Ciclosporin A) [50, 51, 52] und würden damit weniger Nebenwirkungen in Kauf nehmen müssen. Gerade im Hinblick auf subklinische akute Rejektionen verweisen Rush et al. daher auf die mögliche Notwendigkeit wiederholter Protokollbiopsien während der frühen Posttransplantationsphase [53], die selbst jedoch durch ihren invasiven Charakter und möglichen Blutungskomplikationen einen weiteren Beitrag zur Schädigung des Transplantats leisten können. Könnte man durch die nicht- oder weniger invasive funktionelle Messung der spenderreaktiven Immunantwort vorhersagen, für welche Patienten das Risiko für eine immunologische Schädigung des Spenderorgans erhöht ist und bei welchen man die Immunsuppression minimieren kann, so wäre eine optimale, individuelle Therapieanpassung mit den wenigstmöglichen Nebenwirkungen und Risiken aussichtsreich.

2.4 Die Immunantwort

Bedeutung von T-Zellen

Obwohl antigenspezifische und unspezifische Abwehrmechanismen in komplexer Weise zusammenarbeiten, wird heutzutage angenommen, dass die akute Rejektion vor allem ein T-Zell-abhängiger und T-Zell-initiiertes Prozess ist [54]. Dafür spricht, dass die Inzidenz akuter Rejektionen seit Einführung der Calcineurinantagonisten Ciclosporin A und Tacrolimus als

Immunsuppressiva zurückgegangen ist. Calcineurinantagonisten inhibieren selektiv die Aktivierung, Zytokinausschüttung und Proliferation von T-Zellen. Ebenso ist OKT3, ein monoklonaler Antikörper gegen das CD3-Oberflächenmolekül, welches sich nur auf T-Zellen befindet, ein potentes Medikament zur Therapie von akuten Rejektionen mit zum Teil besserer Wirkung als sie hochdosierte Kortikosteroide zeigen [55].

T-Zellaktivierung

Naive T-Zellen, die gereift den Thymus verlassen haben, zirkulieren durch das Blut- und Lymphsystem. Sie werden erst aktiviert, wenn ihr T-Zellrezeptor einen körperfremden MHC-Peptid-Komplex auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle innerhalb eines Lymphknotens in Anwesenheit von kostimulatorischen Signalen erkennt. Dabei sind die T-Zell-Rezeptoren einer Zelle spezifisch für einen körperfremden MHC-Peptid-Komplex. Kreuzreaktionen zu anderen körperfremden MHC-Peptid-Komplexen kommen jedoch vor. MHC-Moleküle sind polymorphe membranständige Proteine, die in einer variablen Bindungsgrube bestimmte Peptide binden können, die sie den T-Zellen präsentieren. Es gibt zwei Hauptklassen von MHC-Molekülen: Während MHC-Klasse I -Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) vor allem intrazelluläre Antigene wie virale, onkogene oder zelleigene Peptide präsentieren und auf den meisten somatischen Zellen exprimiert werden, werden durch MHC-Klasse II -Moleküle (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP), die nur in lymphoiden Geweben, auf monozytären und dendritischen Zellen, B-Zellen und vaskulärem Endothel exprimiert werden, vor allem extrazelluläre Antigene wie bakterielle Peptide oder Apoptose-Zellprodukte präsentiert. MHC-Moleküle der Klasse I werden von T-Zell-Rezeptoren der CD8^{pos}T-Zellen erkannt, MHC-Moleküle der Klasse II von T-Zell-Rezeptoren der CD4^{pos}T-Zellen. Als kostimulatorische Signale dienen Interaktionen zwischen Oberflächenmolekülen der antigenpräsentierenden Zellen (z.B. CD86, CD80, CD40) und deren Liganden auf T-Zellen (CD28, CTLA-4, CD154), wobei auch Zytokine wie IL2 für diese Rolle in Betracht kommen [56, 57].

Nach Aktivierung produziert die T-Zelle zunächst nur das Zytokin IL2 und exprimiert auf der eigenen Zelloberfläche IL2-Rezeptoren. Erst danach löst die Stimulierung der eigenen IL2-Rezeptoren durch IL2 eine Kaskade von Ereignissen aus, die zur Proliferation als auch zur weiteren Differenzierung zur Effektorzelle mit entsprechenden Effektorfunktionen anregt. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Priming“. Der ganze Prozess läuft innerhalb von Tagen ab [58, 58, 60]. Eine Effektorzelle kann dagegen nach einem erneuten Kontakt mit „ihrem“ Fremd-MHC-Peptid-Antigen-Komplex ohne weitere Kostimulation innerhalb von Minuten aktiv

werden. Kehrt eine aktivierte Zelle wieder in eine Art Ruhezustand zurück, wird sie als Gedächtniszelle bezeichnet. Gedächtniszellen brauchen zwar für ihre Reaktivierung bei erneutem Antigenkontakt zusätzliche kostimulatorische Signale, allerdings reicht ein viel kleinerer Stimulus aus, um innerhalb von Stunden in Effektorzellen zu differenzieren, zu proliferieren und Zytokine zu sezernieren [58, 59, 61]

Beide, Effektorzellen und Gedächtniszellen, oder zumindest eine Subpopulation der Gedächtniszellen, die sogenannten Effektor-Gedächtniszellen, können im Gegensatz zu naiven T-Zellen durch Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen (z.B. CD11a) auch durch peripheres Gewebe zirkulieren [62]. Dabei wird vermutet, dass Effektor- und Gedächtniszellen nicht unbedingt professionelle antigenpräsentierende Zellen zur Reaktivierung benötigen, sondern dass die erhöhte Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorisch wirkenden Oberflächenmolekülen auf entzündeten Endothelien in der Peripherie für die Reaktivierung ausreicht [63, 64].

Immunität gegen das Transplantat

T-Zellen erkennen körperfremde MHC-Moleküle oder MHC-Moleküle, die körperfremde Peptide präsentieren, darunter auch Peptide von prozessierten körperfremden MHC-Molekülen. In der Transplantationsmedizin wird daher versucht, jeweils ein Organ zu finden, dass die gleichen MHC-Moleküle exprimiert wie der Empfänger - Spender und Empfänger also zu „matchen“. Dabei wird vor allem auf die MHC-Klasse I -Moleküle HLA-A und HLA-B sowie das MHC-Klasse II -Molekül HLA-DR Wert gelegt. Da die Moleküle kodominant exprimiert werden, ist ein maximales Mismatch von 6 möglich. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Inzidenz von akuten Rejektionen als auch die Langzeitfunktion des Transplantats mit der Anzahl der HLA-Mismatches korreliert ist [13, 24], was einen weiteren Hinweis für die Rolle von T-Zellen bei den immunologischen Reaktionen gegen das Transplantat gibt.

In der Frühphase nach Transplantation werden für die allogene Aktivierung der T-Lymphozyten vor allem die MHC II-exprimierenden dendritischen Zellen des Spenders im Transplantat durch die „direkte Präsentation“ fremder Peptide durch fremde MHC-Moleküle verantwortlich gemacht. Durch Abwanderung dieser antigenpräsentierenden Zellen des Spenders in das lymphoide System des Empfängers wird das Alloantigen nach und nach im gesamten Körper verteilt [65, 66]. In der Spätphase nach Transplantation dominiert die „indirekte Präsentation“ fremder Peptide durch eigene MHC-Moleküle, d.h. die Prozessierung der Fremdantigene durch

die antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers, darunter vor allem auch die Peptide fremder MHC-Moleküle, durch eigene MHC-Moleküle [67, 68].

Da die „indirekte Präsentation“ im Gegensatz zur „direkten Präsentation“ solange stattfinden kann, wie sich das Transplantat und damit Antigen im Körper des Empfängers befindet, wurde die Vermutung geäußert, dass vor allem indirekt geprimte T-Zellen für die Entwicklung einer CTN mitverantwortlich seien [26, 69, 70, 71, 72].

CD4 und CD8 sind akzessorische nichtpolymorphe Oberflächenmoleküle auf T-Zellen, die mit den invarianten extrazellulären Domänen der MHC-Klasse II- bzw. MHC-Klasse I-Moleküle interagieren. CD4^{pos} T-Zellen und CD8^{pos} T-Zellen können im Rahmen akuter Rejektionen verschiedene Funktionen zugeordnet werden:

Funktion der CD4^{pos}T-Zellen: CD4^{pos}T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, proliferieren nach Aktivierung, sezernieren verschiedene Zytokine wie IL2, IFN γ und TNF α und können durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen auf diesen eine verstärkte Expression kostimulatorischer Signale bewirken [73], wodurch eine Proliferation und Differenzierung auch der MHC I-aktivierten CD8^{pos}T-Zellen angeregt wird. Unter weiterer Zytokinproduktion (IFN γ , TNF α) erfolgt eine Rekrutierung von Makrophagen und anderen unspezifischen inflammatorischen Zellen in das Transplantat [65, 74]. Die von ihnen freigesetzten zytolytischen Proteasen und freien Radikale führen zu einer Gewebeschädigung. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass CD4^{pos}T-Zellen für das Auftreten einer akuten Rejektion essentiell sind [75, 76].

Funktion der CD8^{pos}T-Zellen: Die sogenannten zytotoxischen CD8^{pos}T-Zellen können eine direkte Gewebsschädigung auslösen, indem sie in Zielzellen mit spezifischen Fremd-MHC-Peptid-Komplex Apoptose induzieren. Dies geschieht entweder über die Sekretion von Perforin und Granzymen oder den Zell-Zellkontakt zwischen den Oberflächenmolekülen Fas-Ligand (CD95L) und Fas (CD95). Obwohl in Infiltraten von Transplantaten mit einer akuten Rejektion regelmäßig CD8^{pos}T-Zellen nachgewiesen wurden und enge Assoziationen zwischen der Expression zytotoxischer Effektormoleküle wie Perforin und Granzym B in Nierenbiopsaten und einer akuten Rejektion bestehen [77, 78], bleibt die Rolle der zytotoxischen Mechanismen bei akuten Rejektionen unklar. Zwar ist Apoptose Bestandteil der Vorgänge während einer akuten Rejektion [79, 80], jedoch ist Apoptose generell ein nichtinflammatorischer Prozess. Die Bildung von Gewebsektosen, die mit akuten Rejektionen einhergehen, ist nur durch Inflammation und Ischämie erklärbar. Daher stehen möglicherweise auch hier die nichtzytotoxischen Effektormechanismen, vor allem die Sekretion von IFN γ im Vordergrund.

Bedeutung von IFN γ

IFN γ ist ein Zytokin, das hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen sezerniert werden kann. Unter normalen Umständen werden nur sehr geringe Mengen produziert, große Mengen jedoch bei Traumata, Infektionen, malignen Neoplasien, Autoimmunität und Alloimmunität. IFN γ ist im Wesentlichen ein „proinflammatorisches“ Zytokin, das heißt, es reguliert zelluläre Vorgänge, die zu einer Inflammation führen und diese unterhalten. Auf fast allen Körperzellen befinden sich Rezeptoren für IFN γ . Zu seinen vielfältigen Wirkungen zählt die Aktivierung von Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen, die selbst weitere proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL6 und IL1 sezernieren können, sowie eine Hochregulation der Expression von MHC-, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche vieler Zellen bewirken, wodurch die Präsentation von Fremdanigenen erhöht, die Aktivierung von T-Zellen und die Erkennung von antigenen Zielzellen sowie der Eintritt inflammatorischer Zellen in das Gewebe erleichtert wird. Es wird daher vermutet, dass IFN γ auch bei akuten und chronischen Rejektionen eine entscheidende Rolle spielt. So beobachteten Moudgil et al., dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer akuten Rejektion in Lungentransplantierten und der Expression von IFN γ mRNA in der Flüssigkeit einer bronchoalveolären Lavage besteht [81]. Van Besouw et al. testeten die Zytokinsekretion von Lymphozyten, die nach Herztransplantation das Organ infiltriert hatten, wenn sie mit Spenderzellen stimuliert wurden, und fanden innerhalb der ersten 90 Tage post-Tx eine signifikant höhere IFN γ -Sekretion in Lymphozytenkulturen, die von Biopsien während einer akuten Rejektion stammten, im Vergleich zu Lymphozyten aus Kulturen einer Biopsie ohne akute Rejektion [82]. Nagano et al. berichteten wiederum, dass bei Herztransplantationen in IFN γ -Knockout-Mäusen die Rate und Schwere arteriosklerotischer Koronarveränderungen im Sinne einer chronischen Rejektion/Schädigung wesentlich niedriger war als beim Wildtyp. Ähnliches galt für die Verwendung von anti-IFN γ -mAk [83].

Gedächtniszellen und Effektorzellen

Im Gegensatz zu Effektor-T-Zellen, die nach Aktivierung nach wenigen Tagen durch Apoptose sterben (activation induced cell death-AICD) [84], können Gedächtnis-T-Zellen mehrere Jahre überleben, wobei die Bedingungen für ihre Langlebigkeit, wie etwa permanente spezifische oder unspezifische Antigenstimulation, bestimmte Zytokine oder andere Faktoren, nicht vollständig geklärt sind. Die große Anzahl immunologischer Stimulationen, denen der Mensch durch vielfältige Antigene ausgesetzt ist, z.B. virale oder bakterielle Infektionen, Impfungen, Bluttransfusionen und Schwangerschaften, generiert im Laufe des Lebens eine Unmenge von

Gedächtnis-T-Zellen gegen die verschiedensten Antigene. Einige dieser Zellen können mit unterschiedlichen Antigenen kreuzreagieren, wodurch es zu einer Präsensibilisierung eines Organempfängers gegen sein Transplantat kommen kann, ohne dass der Empfänger vor der Transplantation Kontakt mit dem entsprechenden Antigen gehabt hat [85, 86, 87].

Es gibt messtechnisch wenig Möglichkeiten Effektor-T-Zellen und aktivierte Gedächtnis-T-Zellen voneinander zu trennen [88]. Beide unterscheiden sich aber von naiven T-Zellen dadurch, dass sie in wesentlich kürzerer Zeit mit einem Mindestmaß an Antigen- und Kostimulation auch in peripheren Geweben aktiviert werden können und dass sie die Fähigkeit besitzen eine breite Palette von Zytokinen zu sezernieren. Sie sind daher in der Lage, das Transplantat direkt zu attackieren und so eine akute Rejektion auszulösen [89].

Die Messung alloreaktiver Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen könnte daher Auskunft über die momentane Aktivierung des Immunsystems des Empfängers gegen das Transplantat geben, und zwar sowohl vor wie nach der Transplantation.

2.5 Das ELISpot-Assay - Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay

In der Vergangenheit gestaltete sich die Messung alloreaktiver T-Zell-Frequenzen schwierig. Traditionell wurden alloreaktive T-Zellen durch die Messung der proliferativen Antwort in einer „Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR) gemessen. Dabei wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut von zwei Individuen für sechs bis sieben Tage zusammen inkubiert, wobei die Mitose der stimulierenden Zellen durch eine Bestrahlung oder Behandlung mit Mitomycin C verhindert wurde, während die Responderzellen unbehandelt blieben. Diese Methode gab jedoch keine Auskunft über die Anzahl und Funktion der Zellen. Somit waren auch gemessene Zusammenhänge zwischen alloreaktiver Antwort in vitro und Transplantatprognose inkonsistent [90, 91, 92]. Die Methode der „Limiting Dilution Analysis“ (LDA) kann alloreaktive T-Zellen quantifizieren. Sie berechnet dafür die statistische Wahrscheinlichkeit von Responderzellen verschiedener Konzentrationen unter Stimulation zu proliferieren und Effektorfunktion zu erlangen. Die sehr aufwendige Arbeitsweise, die schlechte Standardisierung und die langen Inkubationszeiten stellen einerseits ein Hindernis für die routinemäßige Nutzung dar, können aber andererseits auch Artefakte produzieren z.B. durch Zellklone mit höherer Proliferationsaktivität und relativer Resistenz gegenüber aktivierungsinduzierter Apoptose [93]. Außerdem kann man mit den meisten Varianten der LDA eine Unterscheidung zwischen naiven und geprimten Zellen nicht treffen. Einen weiteren möglichen Ansatz zur Messung

antigenspezifischer T-Zellen bietet die intrazelluläre Zytokinfärbung. Nach Antigenstimulation bilden die spezifischen T-Zellen Zytokine (z.B. $\text{IFN}\gamma$, welche durch Sekretionsinhibitoren im Innern der Zelle festgehalten werden. Durch die zusätzliche Markierung des Zytokins mit einem fluoreszierenden Farbstoff kann die Anzahl der markierten Zellen im Durchflusszytometer erfasst werden. Da die Messschwelle der Durchflusszytometrie bei über $1/10^4$ Zellen liegt, ist die Methode zur Messung alloreaktiver T-Zellen möglicherweise nicht geeignet und bisher auch nicht erfolgreich angewandt worden. Die Weiterentwicklung des ELISpot-Assays durch Heeger et al. [1] ermöglichte daher erstmals die Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer, zytokinproduzierender Zellen innerhalb relativ kurzer Zeit selbst auf einem so niedrigen Niveau wie $1/10^6$ Zellen.

Heeger et al. konnten kürzlich mit Hilfe des ELISpot-Assays zeigen, dass man Effektor- und Gedächtniszellen von naiven Zellen anhand ihres Zytokinprofils zu einem bestimmten Zeitpunkt unterscheiden kann. Während geprimte T-Zellen nach Aktivierung innerhalb von 24 h neben geringen Mengen IL2 vor allem je nach Subspezifizierung $\text{IFN}\gamma$, IL4, IL5 oder andere Zytokine produzieren, können naive Zellen in dieser Zeit nur IL2 sezernieren [58, 94].

Auf diese Art konnten sie die Anzahl $\text{IFN}\gamma$ -produzierender, spenderreaktiver Zellen bei Patienten vor Nierentransplantation messen. Heeger et al. konnten zwischen der Anzahl der $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen und dem HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger keinen Zusammenhang finden. Allerdings fiel auf, dass Patienten mit besonders hohen Werten für $\text{IFN}\gamma$ -produzierende, spenderreaktive Zellen eine frühe akute Rejektion erlitten, während Patienten, bei denen man vor Transplantation keine $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden, spenderreaktiven Zellen nachweisen konnte, rejektionsfrei blieben [95]. Man vermutete daher, dass die gemessenen Zellen Ausdruck des immunologischen Gedächtnisses im Sinne von schneller aktivierbaren Gedächtnis-T-Zellen seien, die bei früherem spenderunspezifischen Antigenkontakt generiert worden waren und nun durch Kreuzreaktion mit dem Spendergewebe zu einer Schädigung des Transplantats führten. Ähnlich wie präformierte Antikörper des Empfängers gegen HLA-Moleküle des Spenders (PRA) zu einer hyperakuten Rejektion führen, könnten spenderreaktive Gedächtniszellen zu einer Sensibilisierung des Empfängers gegen das Spenderorgan vor der Transplantation und zu einer akuten Rejektion des Transplantats nach der Transplantation führen.

3 Aufgabenstellung

Um einen Transplantatverlust und chronische Folgeschäden durch die Aktivierung des Immunsystems gegen das Transplantat zu verhindern, ist die Erfassung von immunologischen Risikofaktoren vor der Transplantation und die frühzeitige Diagnosestellung und Therapieeinleitung akuter Rejektionen nach der Transplantation besonders wichtig. Somit werden heutzutage Empfänger/Spender-Konstellationen bei denen der Transplantatempfänger bereits präformierte Antikörper gegen das Spenderorgan aufweist erfasst und vermieden, um eine hyperakute Rejektion und den durch Komplementreaktion und arterieller Mikrothrombosierung hervorgerufenen schnellen Transplantatverlust zu verhindern. Nach der Transplantation wird durch die regelmäßige Messung von Parametern aus Blut und Urin (z.B. Serumkreatinin) versucht, durch die Funktion der Niere auf mögliche immunologische Schädigungen zu schließen, die gegebenenfalls immunsuppressiv behandelt werden müssen. Das hat zum Nachteil, dass einerseits die immunologische Aktivität gegen das Transplantat erst erkannt wird, wenn die Schädigung zu einem möglicherweise nicht reversiblen Funktionsverlust der Niere geführt hat, andererseits diese bei uneingeschränkter Funktion nicht bemerkt und somit eventuelle Spätfolgen nicht verhindert werden können. Die routinemäßige Nierenbiopsie stellt wegen des einhergehenden Verlustes von Nierengewebe und den möglichen schweren Blutungskomplikationen gerade bei Patienten mit zusätzlicher gerinnungshemmender Medikation keine Alternative dar.

Obwohl T-Zellen als Initiatoren und Vermittler einer akuten Rejektion eines Transplantats gelten, werden spenderspezifische Effektor-T-Zellen routinemäßig bei Nierenpatienten bisher weder vor Transplantation noch im Verlauf nach der Transplantation gemessen. Möglicherweise würde aber gerade eine hohe Anzahl spenderspezifischer Effektor-T-Zellen im Blut des Patienten vor Transplantation als Ausdruck einer zellulären Sensibilisierung einen Risikofaktor für eine nach Transplantation auftretende akute Rejektion darstellen (wie von Heeger et al. vermutet [95]). Falls der Anstieg spenderspezifischer Effektor-T-Zellen nach Transplantation einen Hinweis auf eine immunologische Schädigung des Transplantats lieferte, könnten so eventuell klinische akute Rejektionen früher erkannt und subklinische akute Rejektionen überhaupt diagnostiziert und therapiert werden. Zusätzlich könnte der Erfolg therapeutischer Strategien zur Hemmung/Eliminierung von Effektor- und Gedächtniszellen besser überwacht werden.

In dieser Arbeit wurden daher zwei Ziele verfolgt:

1. Die Anzahl spenderspezifischer, IFN γ -produzierender Effektor-T-Zellen im peripheren Blut von Nierenpatienten sollte im ELISpot-Assay vor und nach der Nierentransplantation gemessen und in Beziehung zu frühen akuten Rejektionen und zur Transplantatfunktion gesetzt werden. Dabei wurde ein Hauptmesszeitraum von drei Monaten post-Tx gewählt, da es galt, einen möglichst frühen prognostischen Marker zu untersuchen, und da in dieser Zeit nach klinischer Erfahrung die meisten akuten Rejektionen aber auch möglicherweise transplantatschädigende, subklinische Rejektionen [9, 15] auftreten. Die Nierenfunktion wurde nach sechs Monaten und nach einem Jahr post-Tx untersucht, da sie zu diesen Zeitpunkten schon als sehr prädiktiv für die Langzeitfunktion des Organs gilt [2]. Zusätzlich wurde der Zusammenhang mit immunologisch sensibilisierenden Faktoren wie der Anzahl der vorangegangenen Bluttransfusionen, Transplantationen, Schwangerschaften, der CMV-Serologie von Empfänger und Spender, dem HLA-Mismatch zwischen Empfänger und Spender und der Hämodialysedauer der Patienten analysiert und der Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapieschemata und der Art der Nierenspende untersucht. Ebenfalls gingen der Nachweis von panelreaktiven Antikörpern (PRA) als Ausdruck einer humoralen Sensibilisierung sowie einer verzögerten Primärfunktion des Transplantats als Hinweis auf eine mögliche sehr frühe akute Rejektion in die Analyse mit ein.
2. Da zum Zeitpunkt der Arbeit noch keine Daten über die Reproduzierbarkeit und Variabilität des ELISpot-Assays vorlagen, sollten Variationskoeffizienten für die Messung antigen-(CMV-)spezifischer und alloreaktiver T-Zellen bestimmt werden. Im Hinblick auf eine mögliche spätere klinische Anwendung wurde außerdem der Versuch unternommen, das ELISpot-Assay methodisch zu optimieren. Daher wurden verschiedene Verfahren ausgetestet, die eine Inhibition der IFN γ -Sekretion durch die Spenderzellen hätten bewirken können. Zu den verwendeten Methoden gehörten die Behandlung der Stimulatorzellen mit den Calcineurininhibitoren Ciclosporin A und Tacrolimus sowie die Depletion der T-Lymphozyten aus den Spenderzellen mit Hilfe magnetischer Anti-CD2-Mikrobeads. Der Einfluss der in der Patientenstudie verwendeten Bestrahlung mit 30 Gray sollte ebenfalls analysiert werden. Weiterhin wurde untersucht, ob die in der Patientenstudie im Assay verwendeten Zellkonzentrationen für die Fragestellung optimal waren oder ob sich andere Konzentrationen als geeigneter für das Verfahren erwiesen.

4 Methoden

Studiendesign

Die Patientenstudie wurde mit Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charité Berlin durchgeführt. Sie war als prospektive, beobachtende Studie angelegt.

52 Patienten, die zwischen Juni 2001 und Mai 2002 in der Charité, Campus Virchow, nierentransplantiert wurden, wurden in die Studie eingeschlossen.

Wenn organisatorisch möglich, wurden im Rahmen eines stationären Aufenthaltes in der Charité oder zu Routineuntersuchungszeitpunkten in der Transplantationsambulanz der Charité direkt vor der Nierentransplantation und vor Anfang einer Immunsuppression, am Tag 1, danach wöchentlich bis Woche 12 von jedem Patienten (in Einzelfällen auch etwa 6-7 Monate post-Tx) 20 ml venöses Vollblut unter Verwendung von Zitratmonovetten abgenommen und am gleichen Tag PBMZ präpariert.

Spenderzellen bei Kadaverspenden wurden am Tag der Transplantation aus einem Stück Milz des Spenders, welches vom HLA-Labor der Charité zur Verfügung gestellt wurde, und bei Lebendspenden aus 500 ml venösem Spenderblut eine Woche vor der Transplantation präpariert. Einige Spenderzellen wurden daraufhin im ELISpot-Assay eingesetzt, die anderen wurden kryo-konserviert, um bei späteren Messzeitpunkten zur Verfügung zu stehen.

PBMZ der Empfänger wurden zu den genannten Zeitpunkten mit frischpräparierten oder kryokonservierten Spenderzellen im ELISpot-Assay stimuliert und die Anzahl resultierender IFN γ -Spots gemessen, welche als Ausdruck aktivierter, spenderreaktiver T-Zellen des Patienten gewertet wurden. Da das Spenderzellmaterial limitiert war, konnte nicht bei allen 52 Patienten zu jedem genannten Zeitpunkt eine Messung durchgeführt werden.

Immunologisch sensibilisierende Charakteristika der Patienten wurden vor Transplantation, eine verzögerte Funktionsaufnahme des Organs sowie akute Rejektionsepisoden innerhalb der ersten sechs Monate post-Tx wurden nach Transplantation erfasst. Etwa sechs und 12 Monate nach Transplantation wurde mit Hilfe der MDRD-Formel und der zu diesen beiden Zeitpunkten im klinischen Labor ermittelten Werte für Serumkreatinin, Serumharnstoff und Albumin die GFR der Spenderniere der Patienten abgeschätzt, da die GFR die Nierenfunktion besser widerspiegelt

als das schneller zu bestimmende Serumkreatinin. Die GFR eines gesunden Menschen mit zwei funktionstüchtigen Nieren beträgt etwa 85-135 ml/min/1,73m² (altersabhängig). Ein Anstieg des Serumkreatinins aus dem Normbereich (0,5-1,2 mg/dl, abhängig von Muskelmasse, Stoffwechsel, Labor) ist jedoch erst bei einer pathologischen Verminderung der GFR um mindestens 50 % zu erwarten.

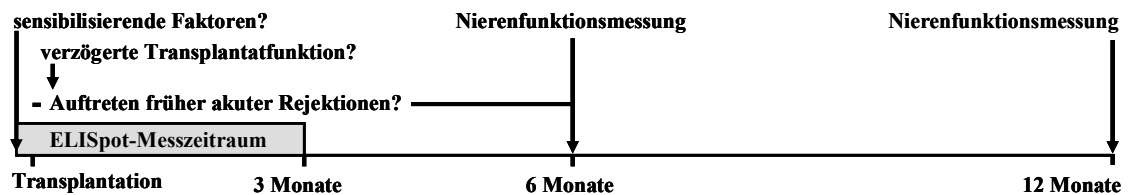


Abbildung 1 Studiendesign

Für methodische Untersuchungen wurde gesunden Probanden venöses Vollblut abgenommen.

Zellpräparation

Präparation mononukleärer Zellen aus Zitratblut

1. 20 ml Zitratblut wurden mit PBS im Verhältnis 1:1 in einem 50 ml-Röhrchen verdünnt.
2. In 14 ml -Röhrchen wurden je 3 ml des Lymphozytentrennmediums Ficoll-Paque vorsichtig mit je 8ml des verdünnten Zitratblutes überschichtet.
3. Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur und 1000 g für 20 min zentrifugiert. Dabei bildeten sich 4 Phasen aus: Ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten, darüber eine Schicht mit Lymphozytentrennmedium, auf der sich ein dünner, weißer Ring mit mononukleären Zellen befand. Die oberste Schicht bestand aus Plasma und Zellfragmenten.
4. Mit einer Pasteur-Pipette wurde der weiße Ring möglichst vollständig abgesaugt und in ein 50 ml Röhrchen überführt.
5. In diesem Röhrchen wurden die mononukleären Zellen zweimal mit 50 ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur und 200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und jeweils verworfen.
6. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert, auf $3-5 \cdot 10^6/\text{ml}$ eingestellt und über Nacht im Brutschrank gelagert.

Präparation mononukleärer Zellen aus Spendermilzanteilen

1. Das kleine Stück Spendermilz wurde aus seinem Kulturmedium entfernt und auf einer sterilen Zellkulturschale von seiner Kapsel und Bindegewebssträngen befreit und in etwa kirschgroße Stücken geschnitten.
2. Die Milzstückchen wurden mit Hilfe eines sterilen Einmalspritzenstempels durch einen 100 µm Maschenfilter (Cellstrainer) in 50 ml Röhrchen gedrückt, wobei häufig mit PBS gespült wurde. Die Filter mit Geweberesten wurden verworfen.
3. Die Zellsuspension wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt.
4. In 50 ml Röhrchen wurden je 15 ml Lymphozytentrennmedium Ficoll-Paque mit 35 ml Milzzellsuspension überschichtet.
5. Die Röhrchen wurden nun bei Raumtemperatur und 1000 g für 20 min zentrifugiert. Dabei bildeten sich erneut 4 Phasen aus (siehe oben).
6. Der weiße Ring auf dem Lymphozytentrennmedium wurde wieder möglichst vollständig abgesaugt und in 50 ml Röhrchen überführt.
7. In diesem Röhrchen wurden die mononukleären Zellen zweimal mit 50 ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur und 200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und jeweils verworfen. Manchmal neigten die Zellen zu Verklumpungen und mussten zwischendurch erneut durch einen 100 µm Maschenfilter (Cellstrainer) gedrückt werden).
8. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert, in Zellkulturflaschen in Kulturmedium aufgenommen, auf $3 - 5 \cdot 10^6/\text{ml}$ eingestellt und über Nacht im Brutschrank gelagert.

Zellzahlbestimmung

Zählen von frisch präparierten, vitalen Zellen:

1. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 190 µl 3 % Essigsäure in Mikrotiterplatten verdünnt.
2. Deckgläser wurden angefeuchtet und gegen die Neubauer-Zählkammer gedrückt bis sogenannte Newton'sche Ringe entstanden.
3. 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden in die Zählkammer eingefüllt.
4. Die hellen, leuchtenden Zellen wurden unter dem Mikroskop in 4 Quadranten gezählt.

Erythrozyten werden bei dieser Methode durch Essigsäure lysiert. Nichtvitale Zellen leuchten zwar auch hell, durch die Präparation werden jedoch zuvor die meisten nichtvitalen Zellen aus der Zellsuspension entfernt.

Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus: $\text{Mittelwert} \cdot 20 \cdot 10^4 = \text{Zellen/ml}$

Zählen von aufgetauten, potentiell nichtvitalen Zellen:

Statt Essigsäure wurde 1 % Trypanblau verwendet.

Nichtvitale Zellen werden bei dieser Methode blau. Erythrozyten leuchten zwar auch hell, durch die Kryokonservierung werden jedoch die meisten Erythrozyten zerstört.

Kryokonservierung von Spenderzellen

Einfrieren von Spenderzellen:

1. Die am Tage zuvor präparierten Spendermilzzellen oder Spender-PBMZ wurden aus dem Brutschrank genommen und die Zellzahl bestimmt.
2. In 50 ml Röhrchen wurden die Zellen bei 200 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Röhrchen mit dem Zellpellet wurde auf Eis gelagert.
3. Das Pellet wurde in eiskaltem Kryomedium (hitzeinaktiviertes FKS+10% DMSO) folgenden Volumens resuspendiert: $\text{Gesamtzellzahl} / 12 \cdot 10^6 \cdot 1,8 \text{ ml}$.
4. Die Zellsuspension wurde auf Eis zu je 1,8 ml in Kryoröhrchen aliquotiert.
5. Die Kryoröhrchen wurden in Iso-Propylalkohol-Gefriergefäßen bei -84 °C eingefroren.

Auftauen von kryokonservierten Spenderzellen

1. Die Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen wurden aus dem Tiefkühler herausgenommen und auf Eis gelagert.
2. Im 37 °C Wasserbad wurden sie so lange aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisrest übrig blieb, danach wurden sie sofort wieder auf Eis gelagert.
3. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt.
4. Auf Eis gelagert wurde zunächst langsam, tropfenweise später etwas großzügiger eiskaltes Kulturmedium hinzugegeben bis eine Verdünnung des Kryomediums von mindestens 1:10 erreicht worden war.

ELISpot-Assay

Prinzip: Für dieses Assay werden 96-Well Platten mit einer synthetischen, weißen Membran am Boden der Wells benutzt. Die Membran wird mit Primärantikörpern gegen das interessierende sezernierte Zytokin (z.B. IFN γ) beschichtet (**a**). Dann wird eine definierte Anzahl von Immunzellen (z.B. PBMZ der Transplantatempfänger) zusammen mit einem Antigenstimulus (z.B. inhibierte Leukozyten des Transplantatspenders) in die einzelnen Wells pipettiert (**b**). Wenn die Immunzellen auf den Stimulus reagieren, produzieren sie Zytokine, die direkt neben ihnen vom Primärantikörper festgehalten werden bevor sie sich im Well verteilen oder von anderen Zellen absorbiert werden können (**c**). Nach einer bestimmten Zeit (z.B. 24 h) werden die Zellen und das Antigen aus den Wells herausgewaschen (**d**) und ein biotinylierter Sekundärantikörper gegen das interessierende Zytokin hinzugefügt, der nur an Stellen, an denen das Zytokin gebunden wurde, haften bleibt (**e**). Der überschüssige Rest wird ausgewaschen. Streptavidin, welches eng an Biotin bindet, führt nach Zugabe über eine enzymatische Reaktion zur Ausfällung eines Chromogens (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol) an den Stellen, an denen Zellen das interessierende Zytokin gebildet haben (**f**). Kleine Flecken, die sogenannten „Spots“, werden dort sichtbar.

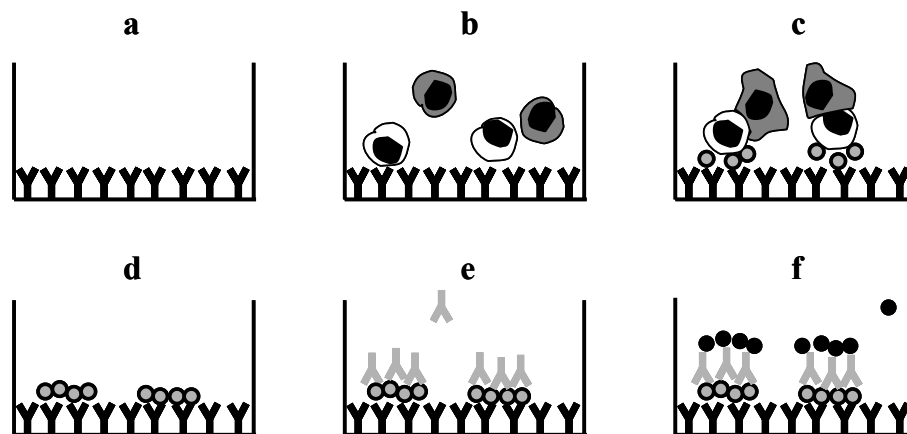


Abbildung 2 Schema zum Mechanismus des ELISpot-Assays

Ein spezielles computergestütztes Gerät (Bioreader) zählt die Anzahl der Spots über eine Kamera, die der Anzahl der zytokinsezernierenden Zellen entspricht.

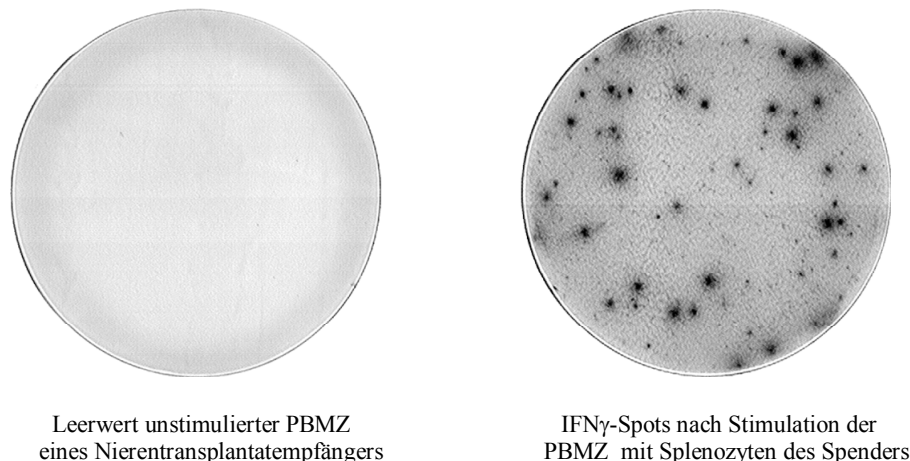


Abbildung 3 Kamerablick auf IFN γ -Spots spenderreaktiver Zellen im ELISpot-Assay

Als Antigene für die Aktivierung von T-Zellen kommen sowohl spezifische als auch unspezifische Substanzen in Frage:

- Fremd-MHC-Peptid-Komplexe oder fremde präsentierte Peptide auf der Oberfläche von Stimulatorzellen aktivieren Effektorzellen via T-Zell-Rezeptor.
- Superantigene wie PHA, ConA oder SEB können über eine direkte Bindung an den T-Zell-Rezeptor an einem Ort, der nicht für die MHC-Komplex-Bindung zuständig ist, unabhängig von einer Kostimulation eine Aktivierung der T-Zelle auslösen.
- Peptide bestimmter Länge, die zu den zu untersuchenden Immunzellen gegeben werden, können bei einem Peptidüberschuss kompetitiv die zelleigenen Peptide aus der Bindungsgrube der MHC-Komplexen verdrängen und ersetzen. Nun präsentieren die zu untersuchenden Zellen auf ihren MHC-Molekülen Fremdpeptide, die wiederum spezifische T-Zellen der untersuchten Zellpopulation aktivieren und zur Zytokinproduktion anregen können.

Während die zweite Möglichkeit, z.B. die Stimulation der Leukozyten mit PHA (PHA aktiviert T-Zellen unspezifisch über die Kreuzvernetzung ihrer CD3-Moleküle. Die resultierende IFN γ -Sekretion dient somit als Kontrolle der Messbarkeit aktivierter T-Zellen im Assay.) als Positivkontrolle des Assays fungieren kann, eignet sich das letzte Verfahren z.B. dazu, die Frequenz CMV-spezifischer Effektor-T-Zellen anhand der Reaktion auf die Präsentation verschiedener Peptide des pp65-Proteins, welches von CMV gebildet wird, zu messen.

Durchführung: Die Behandlung aller Zellen, die im ELISpot-Assay eingesetzt wurden, erfolgte vor bzw. während der Inkubation im Assay unter sterilen Bedingungen.

Tag 1:

1. Die PBMZ der zu untersuchenden Person wurden aus 20 ml Zitratblut präpariert, auf $3\text{-}5 \cdot 10^6/\text{ml}$ in Kulturmedium eingestellt und über Nacht im Brutschrank gelagert.
2. Die 96-Well Multiscreen-Mikrotiterplatte wurde mit einer 12-Kanal-Pipette mit Primär- $\text{IFN}\gamma$ -Antikörpern in sterilem PBS beschichtet ($3 \mu\text{g}$ Primärantikörper/ml PBS; $100 \mu\text{l}/\text{Well}$) und über Nacht in Frischhaltefolie eingewickelt und für mindestens 8 h bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Tag 2:

1. Die mit Antikörpern beschichtete Platte wurde dreimal mit einer 12-Kanal-Pipette mit $200 \mu\text{l}$ PBS/Well gewaschen und auf trockenen Papiertüchern ausgeklopft. Anschließend wurde die Platte für 1-4 h bei Raumtemperatur mit „Blocking Solution“ (PBS-BSA, $200 \mu\text{l}/\text{Well}$) mit Hilfe einer Mehrkanal-Pipette „geblockt“.
2. Die PBMZ der zu untersuchenden Person aus dem Brutschrank wurden auf $3 \cdot 10^6/\text{ml}$ Kulturmedium eingestellt.
3. Die Spendermilzzellen/-PBMZ wurden in 50 ml Röhrchen aufgetaut und anschließend im Blutbestrahlungsgerät mit 30 Gray bestrahlt***. Dabei zeigte sich, dass eine Bestrahlung auf Eis eine ungewollte $\text{IFN}\gamma$ -Produktion vermindert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (beim ersten Mal auf 50 ml mit PBS aufgefüllt, beim zweiten mal mit 50 ml PBS) und für jeweils 10 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und auf $3 \cdot 10^6/\text{ml}$ eingestellt.
4. Nach dem Blocken wurde die Platte dreimal mit $200 \mu\text{l}$ PBS/Well gewaschen und auf trockenen Papiertüchern ausgeklopft.

Die Stimulationsansätze auf der Platte wurden immer als Doppelansatz geführt mit einem Gesamtvolumen von $200 \mu\text{l}/\text{Well}$. Es wurden pro untersuchter Person und Untersuchungstag:

- eine Negativkontrolle der Responderzellen (zwei Wells mit je $100 \mu\text{l}$ Kulturmedium plus $100 \mu\text{l}$ PBM-Zellsuspension; Gesamtzellkonzentration: $3 \cdot 10^5/\text{Well}$),
- eine Negativkontrolle der Stimulatorzellen (zwei Wells mit je $100 \mu\text{l}$ Kulturmedium plus $100 \mu\text{l}$ Spendermilzzellsuspension; Gesamtzellkonzentration: $3 \cdot 10^5/\text{Well}$),

- eine Positivkontrolle der Responderzellen (zwei Wells mit je 100 µl PHA-Lösung einer Konzentration von 20 µg PHA/ml plus 100 µl PBM-Zellsuspension; Gesamtzellkonzentration: $3 \cdot 10^5$ /Well; Gesamt-PHA-Konzentration: 10 µg/ml)
- ein Stimulationsansatz der Responder- und Stimulatorzellen im Verhältnis 1:1 (zwei Wells mit je 100 µl PBM-Zellsuspension plus 100 µl Spendermilzzellsuspension; Gesamtzellkonzentration: $6 \cdot 10^5$ /Well)

angesetzt. Dabei wurden die Ansätze pro Well jeweils mit einer neuen, sterilen Pipettenspitze vorsichtig durchmischt um später eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Boden des Wells zu erzielen.

5. Die Platte wurde nun mit Frischhaltefolie umwickelt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Inkubationszeit lag beim IFN γ -ELISpot-Assay bei 24 h.

Tag 3:

1. Die Platte wurde aus dem Brutschrank genommen, ausgeklopft und dreimal mit einer 12-Kanal-Pipette mit 200 µl PBS/Well gewaschen, wieder auf trockenem Papier ausgeklopft und dreimal mit 200 µl PBS-Tween/Well (Washing Solution) erneut gewaschen.
2. Vor dem letzten Ausklopfen ließ man das PBS-Tween bei Raumtemperatur für 10 min einwirken.
3. 100 µl biotinylierter IFN γ -Sekundärantikörper/Well wurden in einer Konzentration von 2 µg/ml PBS mit einer Mehrkanal-Pipette hinzugegeben.
4. Die Platte wurde über Nacht, jedoch mindestens 4 h, im Kühlschrank bei 4 °C in Frischhaltefolie eingewickelt inkubiert.

Tag 4:

1. Die Platte wurde aus dem Kühlschrank genommen, ausgeklopft und viermal mit 200 µl PBS-Tween/Well gewaschen und auf trockenem Papier ausgeklopft.
2. 100 µl Streptavidin/Well wurden in einer 1:2000 fachen Verdünnung in PBS-BSA-Tween hinzugegeben und für 2-4 h bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Anschließend wurde die Platte je dreimal mit 200 µl/Well PBS-Tween und PBS gewaschen und ausgeklopft.

4. In jedes Well der Platte kamen 200 µl „Visualisierungslösung“. Sie musste stets frisch kurz zuvor aus AEC-Lösung und AEC-Puffer zubereitet werden: AEC-Lösung und AEC-Puffer wurden im Verhältnis 1:30 vermischt, durch einen 0,45 µm-Filter gegeben. Ein 2000stel des AEC-Puffervolumens H₂O₂ wurde hinzugefügt.

Unter Einwirkung des AECs entwickelten sich in den Wells rosafarbene Punkte (Spots) an den Stellen, an denen sich zuvor eine IFN γ -produzierende Zelle befand. Die Entwicklung dauerte 1-5 min. Bevor sich der Hintergrund des Wells ebenfalls rosa färbte, wurde die Reaktion durch Spülung mit Aqua dest. gestoppt.

Die Unterseite der Platte wurde entfernt, damit die Bodenmembran der Wells an der Luft trocknen konnte. Anschließend wurde die Platte mit Hilfe des BIOreaders ausgewertet, der die Punkte (Spots) pro Well zählte. Aus jedem Doppelansatz wurde der Mittelwert errechnet.

*****Nur für methodische Untersuchungen wurden PBMZ von Probanden oder Spendermilzzellen vor Stimulationsbeginn wie folgt behandelt:**

- Es folgte keine Behandlung.
- Die Zellen wurden mit 30 Gray bestrahlt und anschließend zweimal in PBS gewaschen.
- Die Zellen wurden für 30 min, 60 min, 90 min, 120 min oder 24 h mit 1000 ng/ml Ciclosporin im Brutschrank inkubiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen.
- Die Zellen wurden für 2 h mit 200 ng/ml Tacrolimus im Brutschrank inkubiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen.
- CD2-positive Leukozyten wurden mittels MACS (Magnetic Cell Sorting) aus dem Stimulatorzellgemisch entfernt (CD2-depletiert).
- Die Zellen wurden CD2 depletiert, mit 30 Gray bestrahlt und anschließend zweimal in PBS gewaschen.

Um den Einfluss dieser Maßnahmen auf die IFN γ -Sekretion der Zellen zu überprüfen, wurden sie mit 1 µg/Well pp65-Gesamtpeptidmischung, 10 µg/Well PHA oder ebenso behandelten Leukozyten anderer Probanden stimuliert. Näheres Abschnitt 6.5.

CD2^{pos}Zelldepletion durch MACS - Magnetic Cell Sorting

Prinzip: Zellen mit bestimmtem Oberflächenmolekülen können durch dafür spezifische magnetische Antikörper markiert werden. Nur diese markierten Zellen werden dann in einer aus Eisenkügelchen bestehenden Säule in einem Magnetfeld festgehalten, während alle Zellen ohne

diese entsprechenden Oberflächenmoleküle mit Hilfe eines Fließmediums (MACS-Puffer, PBS) ungehindert hindurchgelangen. CD2 ist ein Oberflächenmolekül, welches sich auf T-Lymphozyten, Thymozyten und Natürlichen Killerzellen befindet. Durch die Depletion CD2^{pos} Leukozyten können alle IFN γ -produzierenden Zellen aus einem Leukozytengemisch entfernt werden.

Durchführung:

1. Die frisch präparierten mononukleären Zellen wurden gezählt, mit PBS gewaschen, für 10 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen und verworfen.
2. Das Pellet wurde in einem Gesamtvolumen von 40 μ l MACS-Puffer/ 10^7 Zellen resuspendiert und mit 10 μ l CD2-Hapten-Antikörper (Miltenyi) pro 10^7 Zellen für 15 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.
3. Danach wurden 30 μ l MACS-Puffer/ 10^7 Zellen und 20 μ l Anti-Hapten-MicroBeads-FITC/ 10^7 Zellen hinzugefügt, gut durchgemischt (Schüttler) und die Zellen für 20 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.
4. Ab jetzt musste möglichst schnell und kühl/auf Eis gearbeitet werden, um eine erneute unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern.
5. Die Zellen wurden mit dem 20-fachen Färbevolumen MACS-Puffer gewaschen, bei 300 g für 10 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Zellpellet in 500 μ l kaltem MACS-Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert.
6. Der MidiMACS-Magnet wurde an dem Magnetständer befestigt, eine LD-MACS-Säule für Zelldepletion wurde in den Magneten gehängt und mit 2 ml MACS-Puffer gespült (dabei sollte der Puffer nur durchtropfen, nicht durchgedrückt werden).
7. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette durch einen Prä-Separationsfilter auf die Säule gedrückt, durch die sie tropfenweise durchlief und unterhalb der Säule in einem Röhrchen als CD2-Negativfraktion aufgefangen wurde. Anschließend wurde die Säule mit 3 ml MACS-Puffer gespült, der ebenfalls als Negativfraktion aufgefangen wurde.
8. Die Negativfraktion wurde in PBS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Die Reinheit konnte durchflusszytometrisch kontrolliert werden.

Messung des Anteils der T-Zellen in PBMZ

Prinzip: Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung von Zellen anhand spezifischer Antigene, die durch die Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern erfasst

werden können. Die zu messenden Zellen werden in den Strahlengang eines Lasers gebracht. Haben Zellen mit den zu untersuchenden Antigenen den Antikörper gebunden, so absorbiert der Fluoreszenzfarbstoff die Energie des Lasers und emittiert ein Licht mit der für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge, welches gemessen wird. Gleichzeitig erfährt der Laserstrahl durch Größe und Granularität der Zelle eine charakteristische Streuung, deren Erfassung Informationen über diese Eigenschaften liefert. Zur Messung des Anteils der T-Zellen wurden die Oberflächenantigene CD45 und CD3 mit Hilfe der Farbstoffe Peridinin Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) markiert. Da CD45 auf allen Leukozyten und CD3 nur auf T-Zellen exprimiert wird, konnten somit Leukozyten von Verunreinigungen getrennt und der prozentuale Anteil der T-Zellen bestimmt werden.

Durchführung:

1. Zu 50 µl PBMZ-Suspension einer Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml Medium wurden 10 µl eines Antikörpermischs aus CD3-APC und CD45-PerCP im Verhältnis 3:1 hinzugegeben und gut mit dem Schüttler vermischt.
2. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C inkubiert.
3. Danach erfolgte ein Waschgang mit 1 ml FACS-Puffer.
4. Nach einer Zentrifugation bei 200 g für 5 min wurde der Überstand bis auf wenige µl abgesaugt, in denen das Zellpellet mit Hilfe des Schüttlers resuspendiert wurde.
5. Die Messung der Zellen erfolgte kurz darauf mit dem FACSCalibur-Durchflusszytometer, die Auswertung mit CellQuest.
6. Der verbliebene Anteil T-Zellen in CD2-depletierten PBMZ bzw. Splenozyten konnte ebenfalls über die beschriebene Färbung mit CD3-Antikörpern bestimmt werden. Auf der anderen Seite konnte die Reinheit bezüglich der Depletion auch direkt aus der MACS-Negativfraktion kontrolliert werden, da die magnetischen CD2-Antikörper zusätzlich mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoreszein Isothiocyanat (FITC) markiert waren.

Erfassung transplantationsspezifischer Daten

HLA-Typisierung: HLA-Antigene HLA-A, HLA-B und HLA-DR der Spender und Empfänger wurden mittels Standard-Lymphozytentoxizitätstests und PCR-SSP und/oder PCR-SSO durch das Institut für Transfusionsmedizin der Charité Campus Virchow identifiziert.

Bestimmung panelreaktiver Antikörper: Ein Screening zur Bestimmung von panelreaktiven Antikörpern (PRA) wurde mithilfe eines komplementabhängigen Zytotoxizitätstest bei

Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation routinemäßig alle drei Monate durch das Institut für Transfusionsmedizin der Charité Campus Virchow durchgeführt. Daraus ergaben sich die historisch maximal gemessenen Werte für PRA max. Eine Bestimmung der panelreaktiven Antikörper kurz vor der Transplantation ergab die aktuellen Werte PRA akt.

Diagnose der akuten Rejektion: Eine akute Rejektion des Nierentransplantates wurde durch die histologische Beurteilung eines Transplantatbiopsates nach den Kriterien der Banff-Klassifikation von 1997 durch die Pathologie der Charité gesichert. Eine erfolgreiche, dass heißt kreatininsenkende Rejektionstherapie durch einen Kortikosteroidbolus (3*500 mg Methylprednisolon) zu einem Zeitpunkt, zu dem aus klinischen Gründen keine Biopsie möglich war, wurde ebenfalls als Beweis für eine akute Rejektion angesehen.

Bestimmung der Nierenfunktion: Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR in ml/min/1,73m²) wurde für sechs und 12 Monate nach Transplantation nach der MDRD-Formel berechnet [96].

GFR =

$$\frac{(\text{Albumin (g/dl)})^{0,318} * 1,180 (\text{falls schwarze Hautfarbe}) * 0,762 (\text{falls weiblich})}{(170 * \text{Serumkreatinin (mg/dl)})^{0,999} * \text{Alter (Jahre)}^{0,176} * (\text{Serumharnstoff (mg/dl)} * 0,467)^{0,170}}$$

Statistische Analysen

Die Daten wurden statistisch mit Hilfe von SPSS 11.5 für Windows ausgewertet. Da bei den Datensätzen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen und durch die üblichen Tests (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk) auch meist ausgeschlossen werden konnte, wurden alle statistischen Analysen mit parameterfreien, das heißt rangbasierten Tests durchgeführt. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet, zwischen mehreren Gruppen der Kruska-Wallis-Test. Zusammenhänge zwischen zwei Parametern wurden auf Korrelationen nach Spearman-Rho untersucht.

5 Materialien

Patienten und Probanden

Von den 52 Patienten erhielten 44 Patienten eine Kadaverspende, wovon 32 mit einer immunsuppressiven Therapie bestehend aus anti-IL2R-mAk (Basiliximab), Calcineurininhibitor (Tacrolimus $n = 31$, Ciclosporin A $n = 1$), Mycophenolat Mofetil (MMF) und Methylprednisolon (MP), drei mit Tacrolimus, dem Leflunomidanalogon FK778 und MP (wobei nach drei Monaten FK 778 gegen MMF ersetzt wurde) und sieben der Patienten mit FTY720, Ciclosporin A und MP behandelt wurden. Zwei der Patienten, die eine Kadaverspende erhielten, waren durch frühere Transplantationen mit einem rejektionsassoziierten frühen Organverlust sensibilisiert und erhielten eine spezielle Induktionstherapie bestehend aus einer Niedrigdosis OKT3, anti-TNF-mAk (Etanercept) und anti-CD20-mAk (Rituximab) perioperativ sowie fünf Plasmapheresen postoperativ. Danach wurde auf konventionelle Immunsuppression mit Tacrolimus und MP umgestiegen. Acht Patienten erhielten ein Transplantat von einem Lebendspender und wurden mit anti-IL2R-mAk (Basiliximab), Ciclosporin A, MMF und MP behandelt. Ein Patient der Studie war Asiat, alle anderen Kaukasier. Weitere wichtige Charakteristika der untersuchten Patientengruppe sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

Tabelle 1 Charakteristika der untersuchten Patienten, n = 52

Parameter		Wert
Nierengrunderkrankung:	Chronische Glomerulonephritis	22
	Hämolytisch-urämisches Syndrom	1
	Interstitielle Nephritis	2
	Chronische Pyelonephritis	6
	Polyzystische Niere	15
	Ciclosporintoxizität	1
	Primär maligne Nephrosklerose	1
	Refluxnephropathie	1
	Chronische Niereninsuffizienz o.A.	3
Alter bei Transplantation in Jahren:	Median (Spannweite)	51 (28-69)
Geschlecht:	männlich/weiblich	33/19
Diabetes vor Transplantation:	ja/nein	6/46
Graviditäten (nur Frauen betrachtet):	Median (Spannweite)	1 (0-7)
Patienten mit früheren Tx:	keine/Niere/Leber/Herz	44/6/1/1
Anzahl der Transfusion prä-Tx:	Median (Spannweite)	0 (0-20)
Hämodialysedauer prä-Tx in Monaten:	Median (Spannweite)	80,5 (0-131)
Art des Transplantats:	Lebendspende/Leichenspende	8/44
Spender-/Empfänger-CMV-Serostatus	D+/R+	22
	D+/R-	6
	D-/R+	14
	D-/R-	10
max. PRA prä-Tx:	Median (Spannweite)	0% (0-100 %)
	Patienten mit 0 % max.PRA	33
	Patienten mit > 40 % max.PRA	10
akt. PRA prä-Tx:	Median (Spannweite)	0% (0-80%)
	Patienten mit 0 % akt.PRA	46
	Patienten mit > 40 % akt PRA	1
HLA-Gesamt-Mismatch (A, B, DR):	0/1/2/3/4/5/6	10/6/9/16/8/1/2
Primärfunktion des Organs:	ja/nein/unbekannt	37/14/1
frühe aRx:	ja/nein	18/34
Serumkreatinin nach 6 Monaten in g/dl:	Median (Spannweite)	1,47 (0,67-5,8)
GFR nach 6 Monaten in ml/min/1,73m ² :	Median (Spannweite)	50,6 (13,5-104,3)
Serumkreatinin einem Jahr in g/dl:	Median (Spannweite)	1,43 (0,68-6,97)
GFR nach einem Jahr in ml/min/1,73m ² :	Median (Spannweite)	55,3 (10-109)

Verbrauchsmaterialien und wiederverwendbare Materialien

10 ml Zitratmonovetten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
14 ml „Cellstar“ Polypropylenröhrchen	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
2070 FALCON-Röhrchen (50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
2052 FALCON-Röhrchen (15 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FALCON-Glaspipetten, steril (2-25 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sterile Transferpipetten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen (100 µl, 1000 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen (20 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (50 ml, 100 ml)	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Filtersysteme (500 ml)	Corning Incorporated, Corning, N.Y.,USA
FALCON-Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FALCON-„Cellstrainer“ (100 µm mesh)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Einmalspritzen, steril (10 ml)	Braun, Melsungen ,Deutschland
Einmal-Skalpelle	Becton Dickinson, N.Y.,USA
Objektträger	Menzel-Gläser A1, Essex, England
Prä-Separations Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,Deutschland.
LD-MACS-Zellseparationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
FALCON 96-Well-Mikrotestplatten	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tieffrierröhrchen (1,8 ml)	Nunc Inter Med, Roskilde, Dänemark
96-Well-Multiscreen Mikrotitrierplatten <i>Prod. Name MAIPS 4510</i>	Millipore Corporation, Bedford, USA
Pipetten (10-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
12-Kanal-Pipetten (30-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchenständer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Feinoptik, Bad Blankenburg, Deutschland
MACS-MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MidiMACS, Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
5100 Cryo 1 °C Freezing Container	Nalge Nunc International, Rochester, USA

Geräte

FACSCalibur-Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge, CR4 22	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich H GmbH,
Schüttler, Vortex-Genie2	Scientific Industries, INC, Bohemia, USA
Absaugpumpe Laboport	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus R Standard	Labinstruments GmbH, Crailsheim, Deutschland
Brutschrank EG 110 R	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich
Lichtmikroskop	Olympus, Tokio, Japan

Tiefkühltruhe BT 02 (2722)	COTECH GmbH, Berlin, Deutschland
BIOreader R 3000C	BioSys GmbH, Leverkusen, Deutschland
Wannenbad	Grant Instruments, Cambridge, UK
Laminar-Flow-Box	Kendo, Hanau, Deutschland
Blutbestrahlungsgerät IBL-437C	CIS biointernational, Gif-Sur-Yvette, Frankreich

Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien

phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
---	-----------------------------------

Kulturmedium

1640 RPMI-Medium (500 ml)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
+50 ml Fetales Kälberserum <i>hitzeinaktiviert, 30 min Wasserbad 57 °C</i>	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
+2 mM L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
+100 I.E. Penicillin/ Streptavidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
→ Nach dem Mischen wurde steril gefiltert.	

„Blocking Solution“ PBS-BSA

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+5 g Bovines Serum Albumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
→ Nach dem Mischen wurde steril gefiltert.	

„Washing Solution“ PBS-Tween

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+250 µl Tween 20	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<i>Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat</i>	

PBS-Tween-BSA

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+5 g Bovines Serum Albumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
+250 µl Tween 20	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<i>Polyoxyethylene-Sorbitanmonolaureat</i>	

Tieffriermedium

50 ml Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
<i>hitzeinaktiviert, 30 min Wasserbad 57°C</i>	
+10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Steinheim, Deutschland

MACS-Puffer

→ Vor der Verwendung musste der MACS-Puffer entgast werden.

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+0,5 % Bovines Serum Albumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
+2 mM EDTA	SIGMA, Steinheim, Deutschland
<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>	

FACS-Puffer

500 ml phosphatgepuff. Kochsalzlösung	DULBECCO's, GIBCO, Großbritannien
+0,5 % Bovines Serum Albumin	SERVA, Heidelberg, Deutschland
+0,1 % Natriumazid (NaN_3)	SERVA, Heidelberg, Deutschland

AEC-Lösung

100 mg AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)	SIGMA, Steinheim, Deutschland
in 10 ml DMF (N,N Dimethylformamid)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

AEC-Puffer

148 ml 0,2 M Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
+352 ml 0,2 M Natrium-Azetatlösung <i>Trihydrate ACS Reagent [613-90-4]</i>	SIGMA, Steinheim, Deutschland
+500 ml Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland

→Der pH-Wert wurde auf 5 eingestellt.

weitere Chemikalien

Ficoll-Paque TM PLUS	Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden
Rotipuran [®] 2-Propanol	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland
Biotin	Endogen, Illinois, USA
Streptavidin HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
Trypanblau 1 %	Fluka Chemie, Buchs, Deutschland
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

H ₂ O ₂ 30 %	SIGMA, Steinheim, Deutschland
Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sandimmun ®(Optoral) Lösung 1 ml <i>Ciclosporin</i>	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland
Prograf [®] (tacrolimus injection) 1 ml	Fujisawa GmbH, München, Deutschland

Zellstimulantien und Antikörperkonjugate

Phytohemagglutinin (PHA)	SIGMA, Steinheim, Deutschland
CMV-pp65-Gesamtpeptidmischung Swiss.Prot accession Nr. P0672515-AS- Peptide (11 Überlappungen)	Jerini Biotools, Berlin, Deutschland
IFN γ -Primärantikörper	Endogen, Illinois, USA
IFN γ -Sekundärantikörper	Endogen, Illinois, USA
Anti-CD2 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD3-APC	Becton Dickinson, San Jose, USA
Anti-CD45-PerCP	Becton Dickinson, San Jose, USA

Verwendete Software

SPSS 11.5 für Windows	SPSS Inc., Chicago, USA
MS Office 2003	Microsoft Corp.; Redmont, USA
CellQuest ^{Pro}	Becton Dickinson, San Jose, USA

6 Ergebnisse

In der Theorie stammen die IFN γ -Spots im ELISpot-Assay von spenderspezifischen T-Zellen des Transplantatempfängers, die durch Spenderleukozyten stimuliert wurden. Da jedoch keine weiteren Zytokinmuster oder Oberflächeneigenschaften der sezernierenden Zellen bekannt sind, ist nicht 100 % sicher, dass die Spots tatsächlich von T-Zellen stammen, da theoretisch auch andere Zellen, vorrangig NK-Lymphozyten, IFN γ sezernieren können. Auch die Spezifität der IFN γ -produzierenden Zellen bezüglich des Spenders nicht zu beweisen, da unspezifische Zellen durch die Bildung großer Mengen Zytokine durch benachbarte, spezifische T-Zellen ebenfalls aktiviert werden und IFN γ produzieren könnten (sog. „Byständer“-Effekt). Im Nachfolgenden wird daher statt „spenderspezifische T-Zellen“ nur der Begriff der „spenderreaktiven Zellen“ verwendet. Die Anzahl der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen bezieht sich immer auf $3 \cdot 10^5$ PBMZ, die vom Patienten zum entsprechenden Messzeitpunkt präpariert und im Assay stimuliert wurden. Sie entspricht der Anzahl der Spots/Well. Einen Überblick über die Anzahl und Höhe der ermittelten Werte gibt *Tabelle 2*.

Tabelle 2 Extremwerte und Mediane der zu den verschiedenen Messzeitpunkten ermittelten Werte für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen aller 52 Patienten der Studie ,Spots/ $3 \cdot 10^5$ PBMZ

Zeitpunkt der Analyse	Median	Minimum	Maximum	n
prä-Tx	6	-70,5	1000	42 / 52
Tag 1 post-Tx	0	-150	246	41 / 52
Woche 1 post-Tx	0	-57	74	29 / 52
Woche 2 post-Tx	4,5	-62,5	154	37 / 52
Woche 3 post-Tx	7	-24	315,5	30 / 52
Woche 4 post-Tx	6,5	-9	253	20 / 52
Woche 5 post-Tx	1,3	-24	240,5	17 / 52
Woche 7 post-Tx	0,5	-5	20,5	19 / 52
Woche 8 post-Tx	38,75	0	65,5	14 / 52
Woche 9 post-Tx	2,25	-6	93,5	6 / 52
Woche 10 post-Tx	1	-4,5	39	9 / 52
Woche 11 post-Tx	31,5	-14	107,5	5 / 52
Woche 12 post-Tx	2,5	-58	19	5 / 52
max. ELISpot-Wert post-Tx	42,5	-0,5	315,5	52 / 52
mittl. ELISpot-Wert post-Tx (min. 3 Werte)	6,4	-9,75	125	41 / 52

Bei 14 Patienten konnten weder vor noch zu irgendeinem Zeitpunkt nach Transplantation spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen im venösen Blut gemessen werden, bei neun Patienten nahm die hohe Anzahl vor Transplantation unter Immunsuppression ab. Bei weiteren neun Patienten stieg die Zahl der messbaren spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen nach Transplantation auf Werte, die höher waren als vor Transplantation, bei 14 Patienten waren die Zellen erstmalig nach Transplantation nachweisbar. Bei 38 der 52 Patienten konnten post-Tx maximal über 10 IFN γ -Spots, bei 25 Patienten über 40 IFN γ -Spots und bei zehn Patienten über 100 IFN γ -Spots gezählt werden.

Zweimal kam es vor, dass sehr viele die Spots zu einer roten Fläche konfluieren, so dass die Kamera diese nicht mehr vollständig diskriminieren konnte. In die Auswertung gingen diese Werte mit durch Messerfahrung geschätzten 1000 Spots ein. Waren die Spots ungleichmäßig nur auf einer Hälfte des Well konfluiert, so wurde der Wert auf 600 geschätzt. Letzteres spielte aber nur für die methodischen Optimierungsversuche eine Rolle und werden in Diagrammen mit einem Pfeil nach oben gekennzeichnet.

Bei der Messung ergaben sich zwei Probleme:

Die Bestrahlung der Spenderleukozyten mit 30 Gray konnte deren IFN γ -Sekretion nicht vollständig unterdrücken. Im Gegenteil, sie schien sogar eine spontane IFN γ -Sekretion der Spenderleukozyten zu begünstigen. Das führte mitunter zu hohen Messwerten für IFN γ -produzierende unstimulierte Spenderleukozyten (Stimulatorzellenleerwerte). Da ein Doppelansatz für solche zufälligen Fehler nicht ausreicht, ergab sich nach Abzug des Leerwerts vom Messwert teilweise eine negative Anzahl IFN γ -produzierender Zellen des Empfängers. Dies konnte jedoch im Laufe der Studie durch die Lagerung der Zellen auf Eis während der Bestrahlung vermindert werden. Obwohl solche negativen Werte biologisch nicht begründbar sind, wurden sie dennoch vollständig in der Auswertung berücksichtigt, da der Fehler zufällig und eine statistische Auswertung trotzdem möglich war.

Die ungenügende Deaktivierung der Spenderleukozyten führte zweitens dazu, dass Patienten, die mit OKT3 behandelt wurden, besonders hohe Werte für IFN γ -produzierende Zellen aufwiesen. OKT3 aktiviert T-Zellen unspezifisch, wodurch sie IFN γ bilden können. Allerdings schienen in diesen Fällen nicht die Patienten-PBMZ selbst IFN γ zu bilden, da eine spontane Bildung von IFN γ in den Leerwerten der Patienten-PBMZ nicht zu beobachten war und auch nicht nach Stimulation der Patienten-PBMZ mit PHA, sondern die Spenderleukozyten. Diese wurden möglicherweise durch unspezifisch an Patientenleukozyten gebundenes OKT3

aktiviert. Die Werte, die zum Zeitpunkt der Verabreichung von OKT3 bzw. einige Tage danach gemessen wurden, konnten somit nicht in die Analyse mit einbezogen werden.

Diese beiden Probleme motivierten zu dem Versuch, neben der Patientenstudie das ELISpot-Assay zu optimieren und die IFN γ -Sekretion der Spenderleukozyten zu unterbinden.

6.1 Einige Patientenbeispiele im Verlauf

Patienten ohne Nachweis spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen

Bei 14 Patienten konnten zu keinem Zeitpunkt weder vor noch nach der Nierentransplantation spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen gemessen werden (zu jedem Messzeitpunkt < 10 IFN γ -Spots). In *Abbildung 4* sind drei dieser Patienten exemplarisch dargestellt. Während der ersten drei Monate nach Transplantation lagen bei diesen Patienten die Serumkreatininwerte im Normbereich unter 1 mg/dl. Bei keinem der drei Patienten konnte eine frühe akute Rejektionsepisode beobachtet werden. Die Nierenfunktion dieser Patienten war ein Jahr post-Tx mit einer GFR von über 69 ml/min/1,73m² und einem Serumkreatininwert von unter 1 mg/dl jeweils sehr gut. Die Patienten hatten eine Kadaverspende erhalten und wurden mit Basiliximab, Tacrolimus und Steroiden immunsuppressiv behandelt.

Patienten mit spenderreaktiven Zellen prä-Tx

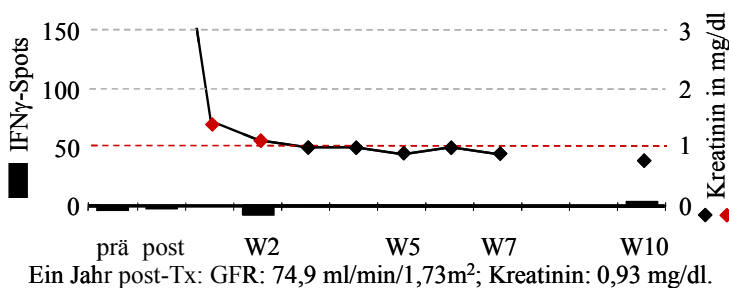
Alle Patienten mit > 200 IFN γ -Spots/3*10⁵ PBMZ vor Transplantation erlitten eine frühe akute Rejektion. Die fünf betroffenen Patienten erhielten eine Kadaverspende und wurden mit Basiliximab, Tacrolimus und Kortikosteroiden immunsuppressiv behandelt - mit Ausnahme von Patient 5, der zunächst mit FTY720, Ciclosporin A und Steroiden therapiert, sechs Wochen nach Transplantation auf Tacrolimus und MMF umgestellt wurde.

In *Abbildung 5* ist der Verlauf der Messwerte für drei der Patienten mit > 200 Spots vor Transplantation dargestellt. Diese drei Patienten erlitten eine schwere akute Rejektionsepisode innerhalb der ersten Woche, die in einem Fall zum Verlust der Organfunktion (Patient 5) und in den anderen Fällen zu einer deutlich eingeschränkten Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation führte (GFR: 33,7 ml/min/1,73m² bzw. 37,5 ml/min/1,73m²). Die beiden letztgenannten Patienten wiesen interessanterweise zu einem Zeitpunkt vor der Transplantation PRA > 40 % auf. Zwei der akuten Rejektionen wurden mit OKT3 behandelt. Die Serumkreatininwerte der Patienten 4 und 5 lagen in den ersten drei Monaten post-Tx

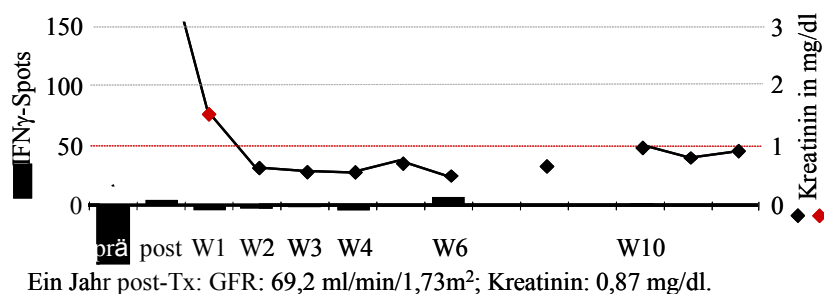
überwiegend weit über dem Normbereich. Bei Patient 6 fiel der Serumkreatininwert vorübergehend in den Normbereich ab.

In *Abbildung 6* kann man die Messwerte der anderen beiden Patienten mit > 200 IFN γ -Spots vor Transplantation verfolgen. Sie erlebten zwar ebenfalls akute Rejektionen (Patient 8 sogar zwei), die jedoch zu einem späteren Zeitpunkt auftraten (Monat 6 bzw. Woche 6 und Monat 4 post-Tx) und mit Kortikosteroiden beherrschbar waren. Das Serumkreatinin lag dabei in den ersten drei Monaten post-Tx über dem Normbereich. Die Nierenfunktion dieser zwei Patienten war nach einem Jahr post-Tx jedoch deutlich besser als die der anderen drei Patienten (GFR: 58 ml/min/1,73m² bzw. 63,5 ml/min/1,73m²).

Patient 1



Patient 2



Patient 3

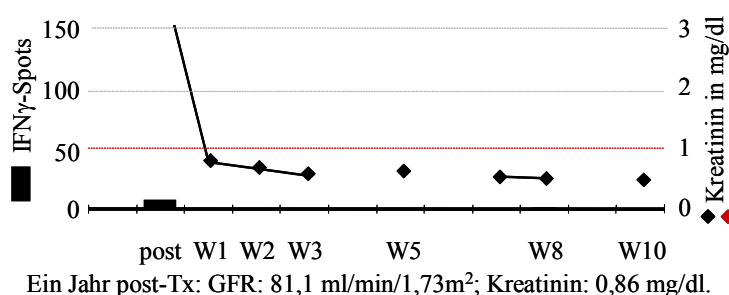


Abbildung 4 Patienten ohne Nachweis spenderreaktiver Zellen vor und nach Nierentransplantation. Die dargestellten Patienten blieben rejektionsfrei und wiesen innerhalb des Messzeitraums Serumkreatininwerte im Normbereich sowie eine gute Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation auf. ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor.

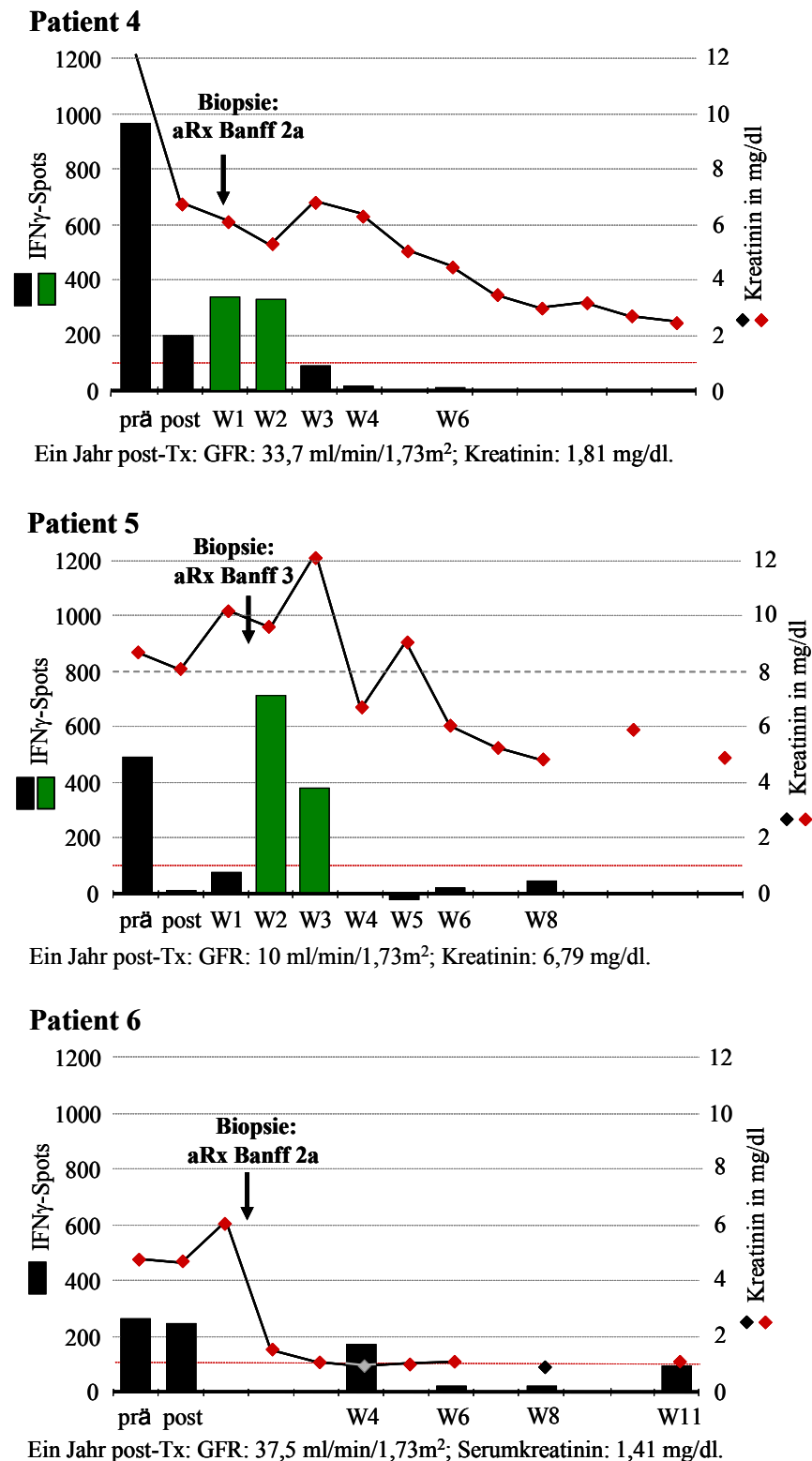
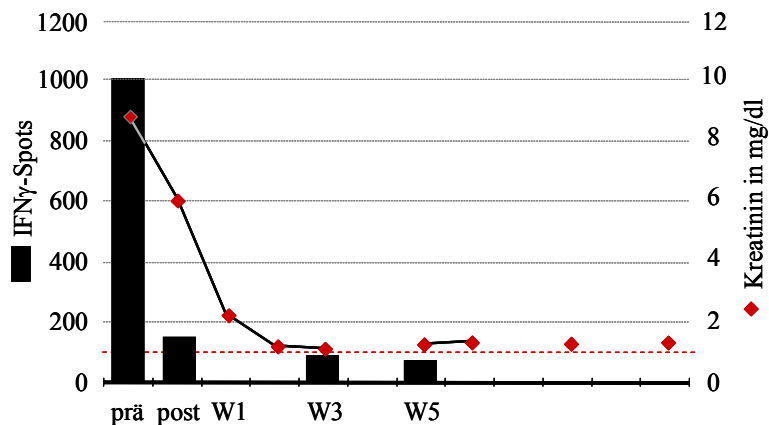
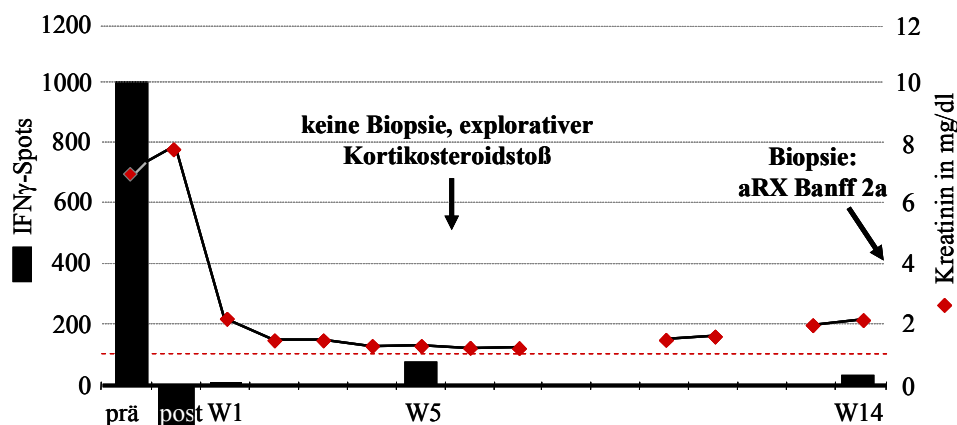


Abbildung 5 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen vor der Nierentransplantation. Die dargestellten Patienten erlitten eine schwere akute Rejektion innerhalb der ersten Woche post-Tx. Während des Messzeitraums lagen die Serumkreatininwerte überwiegend über dem Normbereich. Die Nierenfunktion war ein Jahr nach Transplantation stark eingeschränkt. ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor. Unter OKT3-Behandlung sind diese grün abgebildet

Patient 7

Biopsiebefund in Monat 6: Borderline-Rejektion nach Banff.
Ein Jahr post-Tx: GFR: 63,5 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,4 mg/dl.

Patient 8

Ein Jahr post-Tx: GFR: 58 ml/min/1,73m²; Serumkreatinin: 1,31 mg/dl.

Abbildung 6 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen vor Ttransplantation (2). Die dargestellten Patienten erlitten min. eine akute Rejektion. Bei Patient 8 wurde direkt vor Rejektionsverdacht ein hoher Wert für spenderreaktive Zellen gemessen (70 IFN γ -Spots). Während des Messzeitraums lagen die Serumkreatininwerte über dem Normbereich. Die Nierenfunktion war ein Jahr nach Transplantation jedoch überdurchschnittlich. ELISpot-Messwerte liegen nur zu beschrifteten Zeitpunkten vor.

Patienten mit spenderreaktiven Zellen post-Tx

Bei sieben Patienten, die eine frühe akute Rejektion ihres Organs erlebten, konnte erst nach der Transplantation ein Anstieg der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen beobachtet werden, bei fünf von diesen auf Werte von > 40 IFN γ -Spots. Der Verlauf drei dieser Patienten ist in *Abbildung 7* beispielhaft dargestellt. Diese drei Patienten wiesen während der ersten drei Monate post-Tx überwiegend stark erhöhtes Serumkreatinin auf. Patient 10 und Patient 11 hatten direkt vor einer rejektionsbeweisenden Biopsie einen Anstieg der Anzahl der IFN γ -

Spots. Direkt vor der ersten akuten Rejektion für Patient 11 wurde kein ELISpot-Messwert ermittelt. Bei Patient 9, bei dem zu dem Zeitpunkt, an dem die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen zumindest leicht anstieg, aus klinischen Gründen keine Biopsie möglich war, verbesserte die explorative Gabe hochdosierter Kortikosteroide die Nierenfunktion, was auf eine stattgehabte akute Rejektion hindeutet. Ein Jahr nach Transplantation war die Nierenfunktion der drei Patienten jedoch höchst unterschiedlich zwischen 17,5 ml/min/1,73m² und 58,5 ml/min/1,73m², wobei das Transplantat von Patient 11 zusätzlich einen toxischen Tubulusepithelschaden aufwies. Alle drei Patienten hatten eine Kadaverspende erhalten und wurden mit Basiliximab, Tacrolimus und Steroiden immunsuppressiv behandelt.

Bei 15 Patienten, bei denen zu einem oder mehreren Zeitpunkten nach Transplantation eine hohe Anzahl von IFN γ -produzierenden Zellen (> 40 IFN γ -Spots) gemessen wurde, konnte keine frühe akute Rejektion nachgewiesen werden. In *Abbildung 8* wird der Verlauf der Messwerte von vier dieser Patienten exemplarisch verdeutlicht. Trotz fehlenden Nachweises schädigender Einflüsse wie Toxizität von Immunsuppressiva, Hochdruckschäden, Harnstauung oder Entzündungen des Transplantats waren die Kreatininwerte bei diesen vier Patienten innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation überwiegend über den Normbereich erhöht und die Nierenfunktion war ein Jahr post-Tx mit einer GFR von jeweils unter 44 ml/min/1,73m² bei allen vier Patienten eingeschränkt. Die Patienten hatten eine Kadaverspende erhalten und wurden mit Basiliximab, Tacrolimus und Steroiden immunsuppressiv behandelt.

Patienten, die eine OKT3-Induktionstherapie erhielten

Zwei Patienten erhielten als immunsuppressive Therapie ein spezielles Induktionsschema. Dabei wurde unter anderem OKT3 perioperativ als Bolus (bei Patient 16 auch am Tag 4 nach Transplantation) gegeben. Ziel dieser Therapie ist eine Induktion von AICD (activation induced cell death) der Gedächtniszellen. OKT3 bindet an das CD3-Molekül von T-Zellen und führt zu ihrer Aktivierung und zur Sekretion von IFN γ . Da diese IFN γ -Sekretion alloantigenunabhängig ist, konnten die gemessenen Werte für den Zeitraum der Behandlung mit OKT3 sowie einige Tage danach nicht in die Analyse miteinbezogen werden. Bei beiden Patienten wurde zu einem späteren Zeitpunkt nach Transplantation eine erhöhte Anzahl von IFN γ -produzierenden Zellen nachgewiesen (Patient 16: Woche 8 und Woche 11; Patient 17: Woche 4, Woche 8 und Monat 7 - letzteres nicht dargestellt). Trotzdem sank das Serumkreatinin nach Transplantation dauerhaft auf Normwerte und keiner der beiden Patienten erlitt eine frühe akute Rejektionsepisode. Beide hatten ein Jahr nach Transplantation eine gute Nierenfunktion (GFR: 72,7 ml/min/1,73m² bzw. 109,17 ml/min/1,73m²) [*Abbildung 9*].

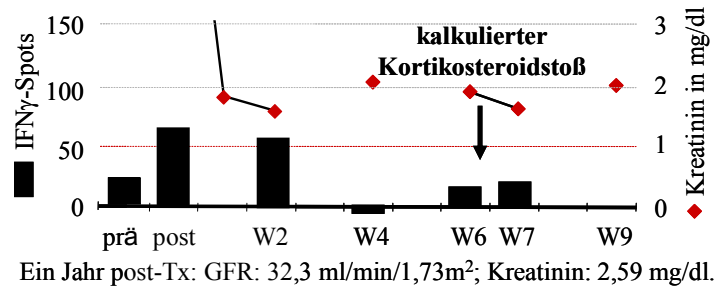
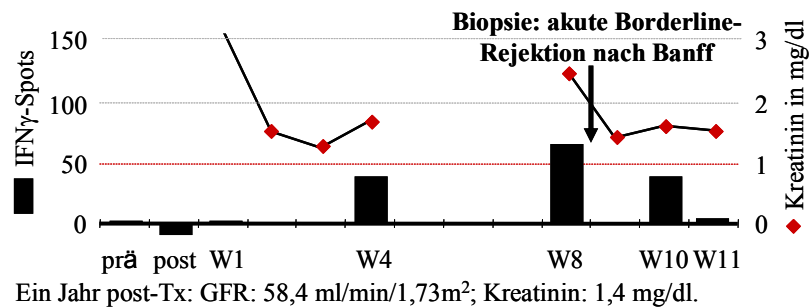
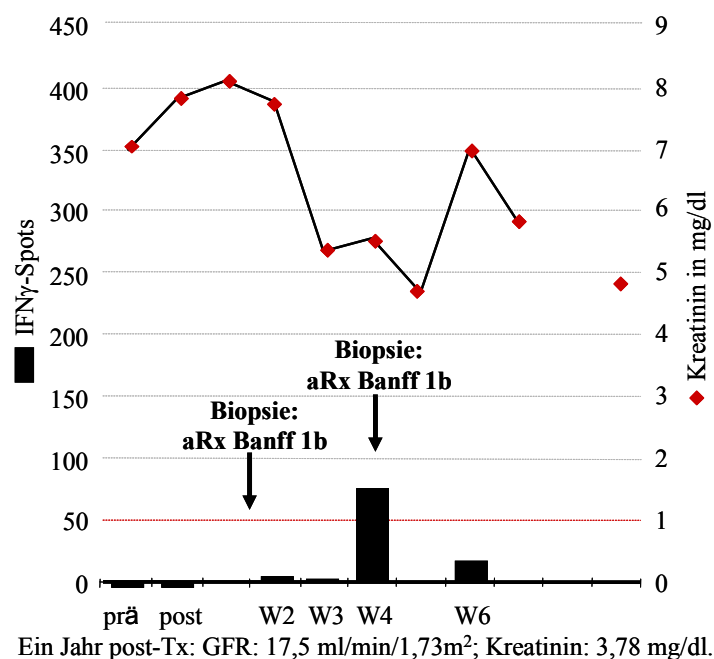
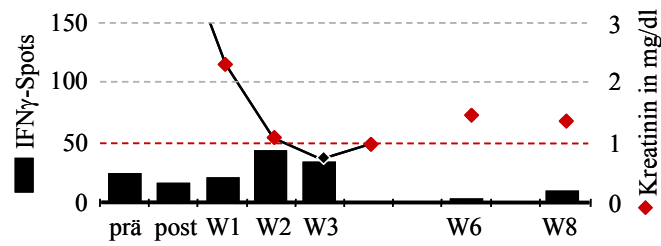
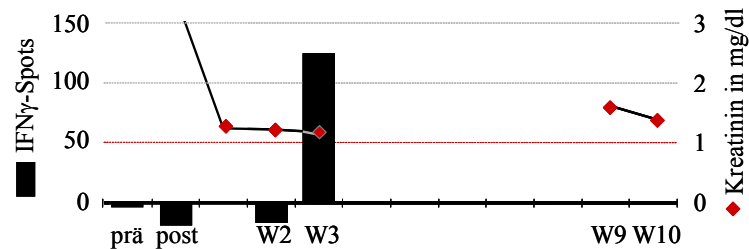
Patient 9**Patient 10****Patient 11**

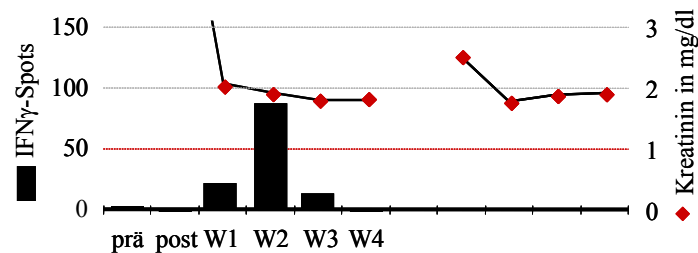
Abbildung 7 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen nach der Nierentransplantation. Die dargestellten Patienten erlitten mindestens eine frühe akute Rejektion. Teilweise konnte direkt nach dem Anstieg der Werte für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen die Diagnose einer akuten Rejektion gestellt werden. Während des Messzeitraums lagen die Serumkreatininwerte über dem Normbereich. Die Nierenfunktion war ein Jahr nach Transplantation teilweise stark eingeschränkt. ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor.

Patient 12

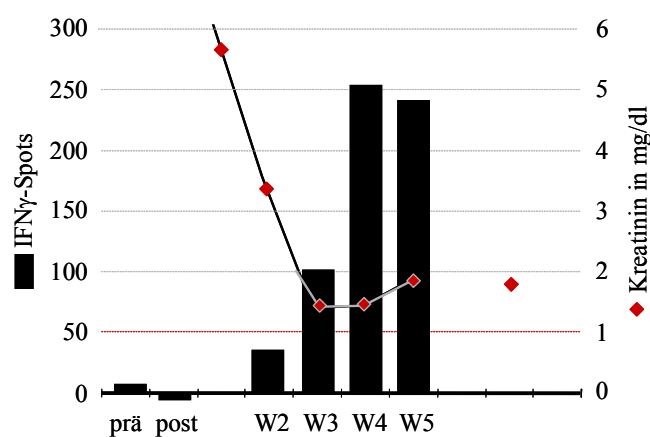
Ein Jahr post-Tx: GFR: 39 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,39 mg/dl.

Patient 13

Ein Jahr post-Tx: GFR: 34 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,49 mg/dl.

Patient 14

Ein Jahr post-Tx: GFR: 44 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,63 mg/dl.

Patient 15

Ein Jahr post-Tx: GFR: 36 ml/min/1,73m²; Kreatinin: 1,56 mg/dl.

Abbildung 8 Patienten mit spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen nach Transplantation (2). Bei den dargestellten Patienten wurde keine akute Rejektion diagnostiziert. Trotzdem lagen die Serumkreatininwerte während des Messzeitraums über dem Normbereich und die Nierenfunktion war ein Jahr post-Tx eingeschränkt. ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor.

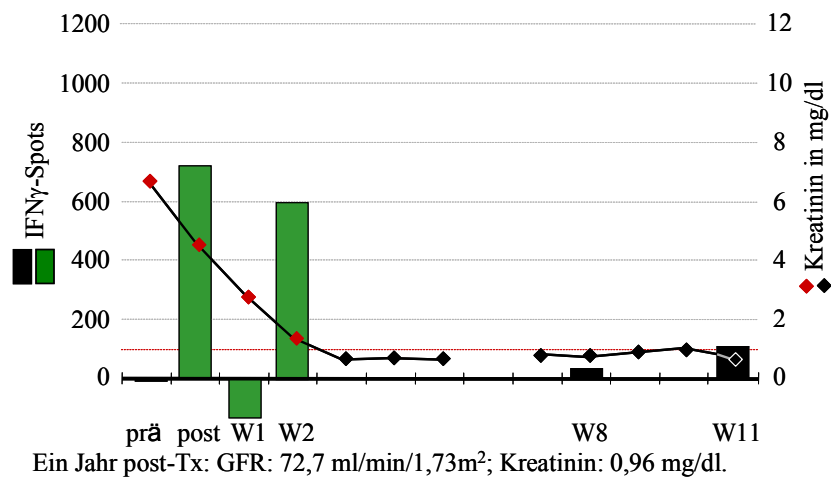
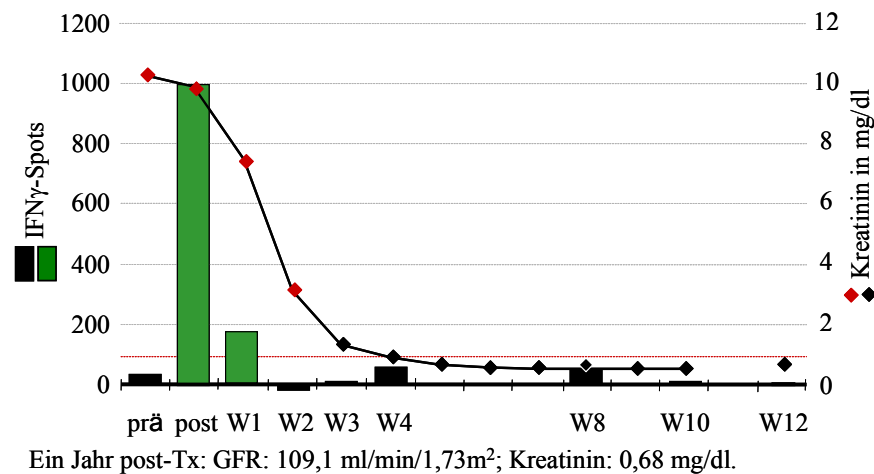
Patient 16**Patient 17**

Abbildung 9 Patienten mit OKT3-Induktionsschema. Obwohl bei den zwei Patienten einige Wochen post-Tx erhöhte Werte für spenderreaktive Zellen gemessen werden konnten, stiegen die Serumkreatininwerte während des Messzeitraums nie über den Normbereich und die Nierenfunktion war ein Jahr post-Tx sehr gut. Unter OKT3-Therapie stiegen die Messwerte fehlerhaft an (grün). ELISpot-Messwerte liegen nur zu den beschrifteten Zeitpunkten vor.

Für die statistische Analyse aller Werte wurde die untersuchte Patientengruppe als Ganzes, sowie die nach immunsuppressiven Therapieschemata unterschiedenen Subgruppen untersucht.

6.2 Spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen prä-Tx

Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen

Bei 42 der 52 an der Studie beteiligten Patienten konnte direkt vor Transplantation und vor Beginn einer immunsuppressiven Therapie die Anzahl der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen in PBMZ im ELISpot-Assay bestimmt werden. Dabei liegen von zwei der insgesamt 18 Patienten, die eine frühe akute Rejektion ihres Organs erlitten, keine prä-Tx-Werte vor.

Patienten mit einer frühen akuten Rejektion zeigten signifikant höhere Frequenzen IFN γ -produzierender Zellen als Patienten ohne nachgewiesene akute Rejektionsepisode ($p = 0,047$). Während jedoch eine Zellzahl von $< 200/3 \cdot 10^5$ PBMZ keinen Vorhersagewert besaß, erlitten alle fünf Patienten mit Werten über 200 Spots eine frühe akute Rejektion [Abbildung 10].

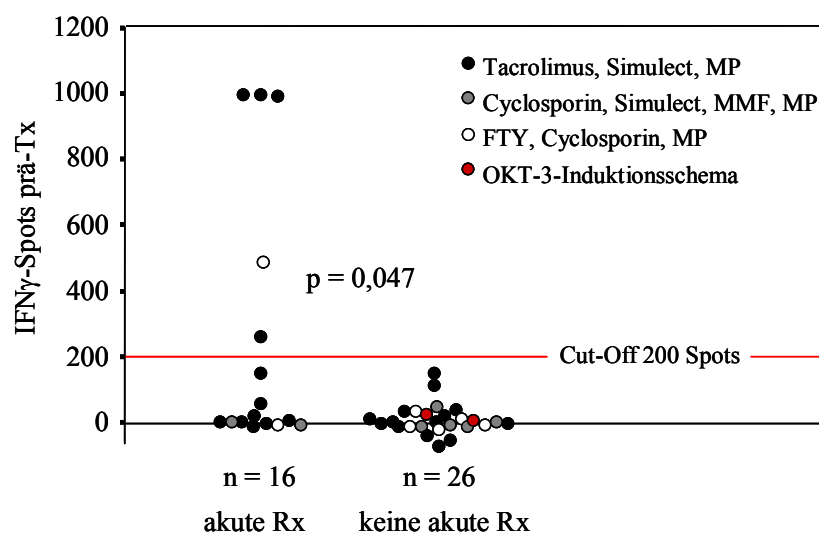


Abbildung 10 IFN γ -produzierende, spenderreaktive Zellen vor Transplantation bei Patienten mit und ohne Nachweis einer akuten Rejektion ihrer Spenderniere.

In Abschnitt 6.1 und *Tabelle 3* werden Transplantatverlauf und transplantationsspezifische Charakteristika dieser fünf Patienten näher aufgeführt.

Tabelle 3 Sensibilisierungsfaktoren und Transplantationsverlauf der Patienten mit über 200 IFN γ -produzierenden, spenderreaktiven Zellen/ $3 \cdot 10^5$ PBMZ vor Transplantation.

Pat.-nr.	prä-Tx Wert	aRx	PRA (%) akt/max	früh. Tx	früh. Grav.	früh. Transf.	Dialyse-dauer	HLA-Mismatch	GFR 1 Jahr post-Tx (ml/min/1,73m ²)
4	263	W1	4/63	0	0	2	116 M	2	37,5
5	490	W1	0/0	0	0	0	19,5 M	3	10
6	996	W1	0/44	1	1	2	95 M	0	33,7
7	≥ 1000	M6	0/0	0	0	0	81 M	2	63,5
8	≥ 1000	W6	0/0	1	0	0	36 M	6	58

Zusammenhang mit der Nierenfunktion

Weder innerhalb der Gruppe aller 42 Patienten noch in nach den verschiedenen immunsuppressiven Therapien unterteilten Subgruppen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl IFN γ -produzierender Zellen vor der Transplantation und der Nierenfunktion sechs Monate und ein Jahr nach der Transplantation gezeigt werden.

Zusammenhang mit Sensibilisierungsfaktoren

Patienten, bei denen vor Transplantation nie PRA (max.) nachgewiesen werden konnten, wiesen generell statistisch signifikant weniger spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen vor Transplantation auf als Patienten, bei denen vor Transplantation PRA gemessen werden konnten ($p = 0,026$). Trotzdem konnten auch bei drei der 27 Patienten, bei denen vor Transplantation nie PRA nachgewiesen werden konnten, hohe Zellfrequenzen über 200 Spots und bei zwei weiteren über 100 Spots prä-Tx gemessen werden [Abbildung 11].

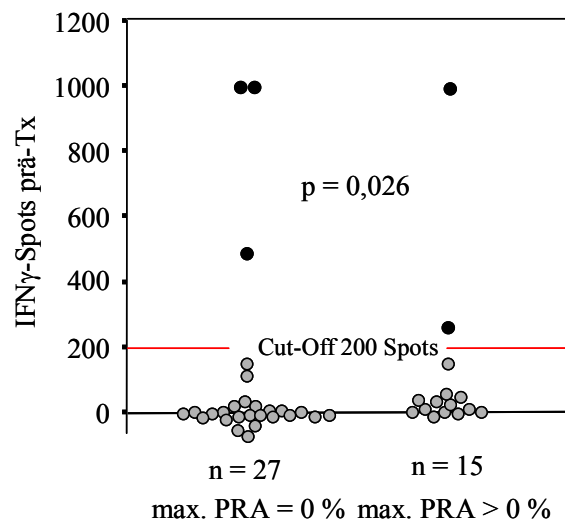


Abbildung 11 IFN γ -produzierende, spenderreaktive Zellen vor Transplantation bei Patienten mit und ohne Nachweis präformierter Anti-HLA-Antikörper (PRA).

Bei vier von fünf Patienten mit über 200 Spots prä-Tx waren direkt vor der Transplantation keine PRA (akt.) messbar und der fünfte Patient wies lediglich ein PRA-Niveau von 4 % auf. Bei dem Patienten mit dem höchsten Wert für PRA direkt vor der Transplantation von über 80 % konnten nur sechs spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen auf $3 \cdot 10^5$ PBMZ mittels ELISpot-Assay gemessen werden.

Weiterhin konnte kein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen vor der Transplantation gemessen im ELISpot-Assay und der Anzahl vorhergehender Schwangerschaften, Bluttransfusionen, vorhergehender Allotransplantationen, der Hämodialysedauer in Monaten und dem HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger (schwankte z.B. bei Patienten mit prä-Tx-Werten von über 200 Spots zwischen 0 und 6) gefunden werden. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede der IFN γ -produzierenden Zellen vor Transplantation im Zusammenhang mit der Primärfunktion versus verzögerte Transplantatfunktion und den CMV-Serologien der Spender und Empfänger.

Zusammenhang zwischen spenderreaktiven Zellen prä- und post-Tx

Die Zahl der vor Transplantation gemessenen spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen zeigte eine signifikante Korrelation mit der nach Transplantation gemessenen Anzahl am Tag 1 post-Tx ($r_s = 0,465$; $p = 0,005$; $n = 35$), in Woche 3 ($r_s = 0,467$; $p = 0,019$; $n = 25$) und dem maximalen nach der Transplantation gemessenen Wert ($r_s = 0,542$; $p = 0,000$; $n = 42$). Dabei erreichten drei Patienten mit Werten über 200 Spots vor Transplantation auch die höchsten

Werte am Tag 1 post-Tx, welche gleichzeitig auch die Maximalwerte nach Transplantation darstellten. Unabhängig von diesen drei Patienten korrelierten die Werte vor Transplantation jedoch trotzdem mit dem höchsten gemessenen Wert nach Transplantation ($r_s = 0,454$; $p = 0,004$; $n = 39$).

6.3 Spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen post-Tx

Zusammenhang mit der Nierenfunktion

Bei allen 52 in der Studie eingeschlossenen Patienten konnte zumindest einmal innerhalb von drei Monaten nach Transplantation ein Wert für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen gemessen werden und daher ein Maximalwert bestimmt werden. Die Mittelwerte aller, jedoch mindestens drei Werte nach Transplantation innerhalb der ersten drei Monate, konnten für 41 Patienten errechnet werden. Zusätzlich wurde analysiert inwieweit bestimmte Zeitpunkte für die Messung von spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen nach Transplantation entscheidend sind. In die Untersuchung gingen somit sowohl die maximalen und mittleren ELISpot-Werte als auch die einzelnen Wochenwerte sowie Mittelwerte zweier aufeinander folgender Wochen ein.

Sowohl in der gesamten Kohorte als auch in den Untergruppen

(a) ohne Patienten, die mit FTY720 oder OKT3-Induktionsschema behandelt wurden ($n = 43$)

(b) nur mit Tacrolimus behandelte Patienten ($n = 35$)

korrelierten der maximale und der mittlere ELISpot-Wert nach Transplantation signifikant negativ mit der GFR nach einem Jahr post-Tx.

Interessanterweise zeigten die durchschnittlichen spenderreaktiven Zellfrequenzen aller untersuchten Patienten der Woche 1 und 2 und der Woche 2 und 3 post-Tx eine signifikant positive Korrelation mit dem Serumkreatinin nach sechs Monaten und einem Jahr post-Tx und eine signifikant negative Korrelation mit der GFR nach sechs Monaten und einem Jahr post-Tx. *Tabelle 4* fasst diese Ergebnisse für die gesamte Patientengruppe zusammen:

Tabelle 4 Korrelationen zwischen der Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen und der Nierenfunktion sechs Monate bzw. ein Jahr post-Tx innerhalb der gesamten untersuchten Patientengruppe, 1: n = 51; 2: n = 48; 3: n = 40; 4: n = 39; 5: n = 41; 6: n = 42

	max. ELISpot-Wert post-Tx	mittl. ELISpot-Wert post-Tx	Mittelwert post-Tx Woche 1 und 2	Mittelwert post-Tx Woche 2 und 3
Serumkreatinin 6 Monate post-Tx	r = 0,163 p = 0,252 ¹	r = 0,248 p = 0,123 ³	r = 0,384 p = 0,012 ⁶	r = 0,325 p = 0,038 ⁵
GFR 6 Monate post-Tx	r = -0,216 p = 0,127 ¹	r = -0,323 p = 0,042 ³	r = -0,310 p = 0,046 ⁶	r = -0,350 p = 0,025 ⁵
Serumkreatinin 1 Jahr post-Tx	r = 0,402 p = 0,005 ²	r = 0,311 p = 0,054 ⁴	r = 0,453 p = 0,004 ⁴	r = 0,349 p = 0,029 ⁴
GFR 1 Jahr post-Tx	r = -0,432 p = 0,002 ²	r = -0,414 p = 0,009 ⁴	r = -0,447 p = 0,004 ⁴	r = -0,390 p = 0,014 ⁴

Ein ähnlicher Zusammenhang fand sich auch allein zwischen den ELISpot-Werten der Woche 2 und der Nierenfunktion nach Transplantation. Er war allerdings nicht so deutlich ausgeprägt und für die GFR nach sechs Monaten auch nicht signifikant (GFR nach einem Jahr post-Tx: $r_s = 0,36$; $p = 0,036$; $n = 34$). Die ELISpot-Werte der Woche 1 korrelierten nur mit der GFR ein Jahr nach Transplantation ($r_s = 0,396$; $p = 0,045$; $n = 26$).

Um die Zusammenhänge grafisch zu verdeutlichen, wurde für die maximalen, die mittleren und die durchschnittlichen ELISpot-Werte der Wochen 2 und 3 ein Cut-Off gewählt, der bei 40, 5 bzw. 10 Spots liegt. Die Gruppen der Patienten, deren Werte für spenderreaktive Zellen über bzw. unterhalb dieses Cut-Offs liegen, unterscheiden sich im Median ihrer GFR ein Jahr nach Transplantation [Abbildung 12]:

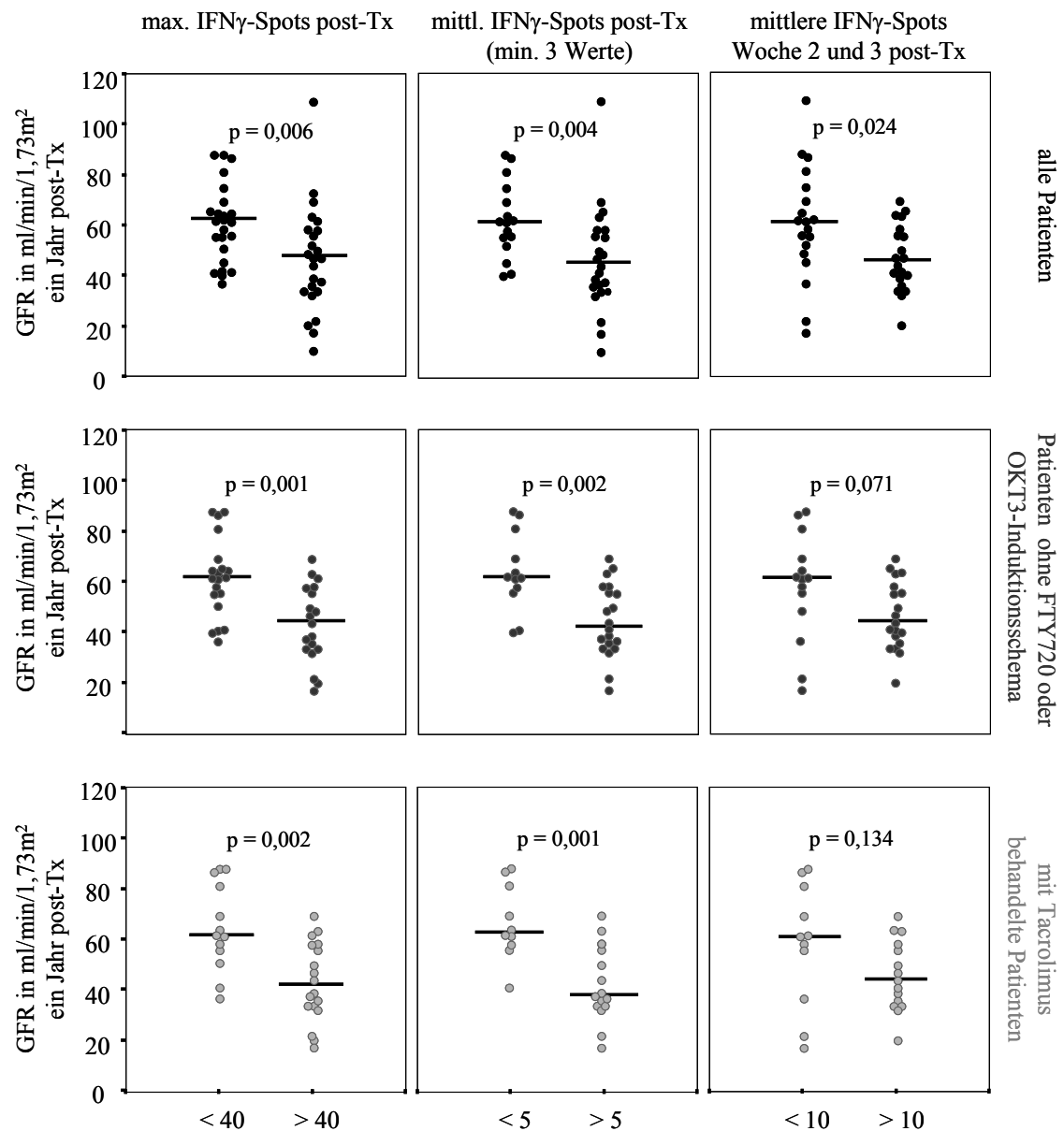


Abbildung 12 Nierenfunktion ein Jahr post-Tx bei Patienten mit Werten spenderreaktiver Zellen post-Tx über bzw. unter einem experimentell ermittelten Cut-Off. Die Gruppen unterscheiden sich in ihrem Median (schwarzer Balken) teilweise signifikant.

Überraschenderweise fielen allerdings drei Patienten auf, die bei hohen maximalen Zellfrequenzen nach Transplantation eine gute Nierenfunktion und keine Rejektionsepisode aufwiesen. Patient 18 der Tacrolimusgruppe erreichte in Woche 3 einen Spitzenwert von über 300 Spots (Serumkreatinin ein Jahr post-Tx: 1 mg/dl; GFR ein Jahr post-Tx: 69,1 ml/min/1,73m²).

Auffallend war, dass dieser Patient in der Zeit vor der Transplantation 20 Bluttransfusionen erhalten hatte. Bei den Patienten 16 und 17, die mit dem OKT3-Induktionsschema behandelt

wurden, waren zu viel späteren Zeitpunkten über 100 Spots (Woche 11) bzw. über 200 Spots (Monat 7) nachweisbar (Serumkreatinin und GFR ein Jahr post-Tx siehe *Abschnitt 6.1*).

Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen

Da akute Rejektionen einen Risikofaktor für die Langzeitfunktion der Transplantatniere darstellen, sollte im folgenden geprüft werden, inwieweit auch subklinische Prozesse erfasst werden.

Auch bei der Analyse der Patientengruppe, in der keine klinisch detektierbaren akuten Rejektionen auftraten, korrelierten der maximale und der mittlere Wert spenderreaktiver Zellen nach Transplantation signifikant negativ mit der GFR nach einem Jahr post-Tx, auch in den Untergruppen **(a)** und **(b)**.

Der Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen in Woche 2 und 3 post-Tx und der Nierenfunktion sechs Monate und ein Jahr post-Tx wurde bei Patienten ohne nachgewiesene Rejektion sogar noch deutlicher. Dies gilt auch für die untersuchten Untergruppen **(a)** und **(b)**.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Korrelationen von spenderreaktiven Zellen und der Nierenfunktion nach Transplantation bei Patienten ohne frühe akute Rejektionsepisode:

Tabelle 5 Korrelationen zwischen der Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen und der Nierenfunktion sechs Monate bzw. ein Jahr post-Tx innerhalb der Patientengruppe ohne frühe akute Rejektionen, 1: n = 33; 2: n = 32; 3: n = 27; 4: n = 26; 5: n = 29; 6: n = 28; 7: n = 30

	max. ELISpot-Wert post-Tx	mittl. ELISpot-Wert post-Tx	Mittelwert post-Tx Woche 1 und 2	Mittelwert post-Tx Woche 2 und 3
Serumkreatinin 6 Monate post-Tx	r = 0,185 ₁ p = 0,303	r = 0,271 ₃ p = 0,171	r = 0,339 ₇ p = 0,067	r = 0,544 ₅ p = 0,002
GFR 6 Monate post-Tx	r = -0,139 ₁ p = 0,441	r = -0,275 ₃ p = 0,164	r = -0,197 ₇ p = 0,297	r = -0,545 ₅ p = 0,002
Serumkreatinin 1 Jahr post-Tx	r = 0,405 ₂ p = 0,021	r = 0,338 ₄ p = 0,091	r = 0,403 ₅ p = 0,030	r = 0,511 ₆ p = 0,005
GFR 1 Jahr post-Tx	r = -0,434 ₂ p = 0,027	r = -0,362 ₄ p = 0,042	r = -0,415 ₅ p = 0,025	r = -0,636 ₄ p = 0,000

Von besonderer Bedeutung scheinen die Messwerte der IFN γ -produzierenden Zellen in Woche 2 nach Transplantation zu sein, da diese auch allein mit der GFR nach sechs Monaten und nach einem Jahr korrelieren: $r_s = 0,411$; $p = 0,030$; $n = 28$ bzw. $r_s = 0,570$; $p = 0,002$; $n = 27$.

Bei den Patienten ohne akute Rejektion unterscheiden sich die Gruppen der Patienten, deren Werte für spenderreaktive Zellen über bzw. unterhalb eines Cut-Offs liegen, im Median ihrer GFR ein Jahr post-Tx [Abbildung 13]:

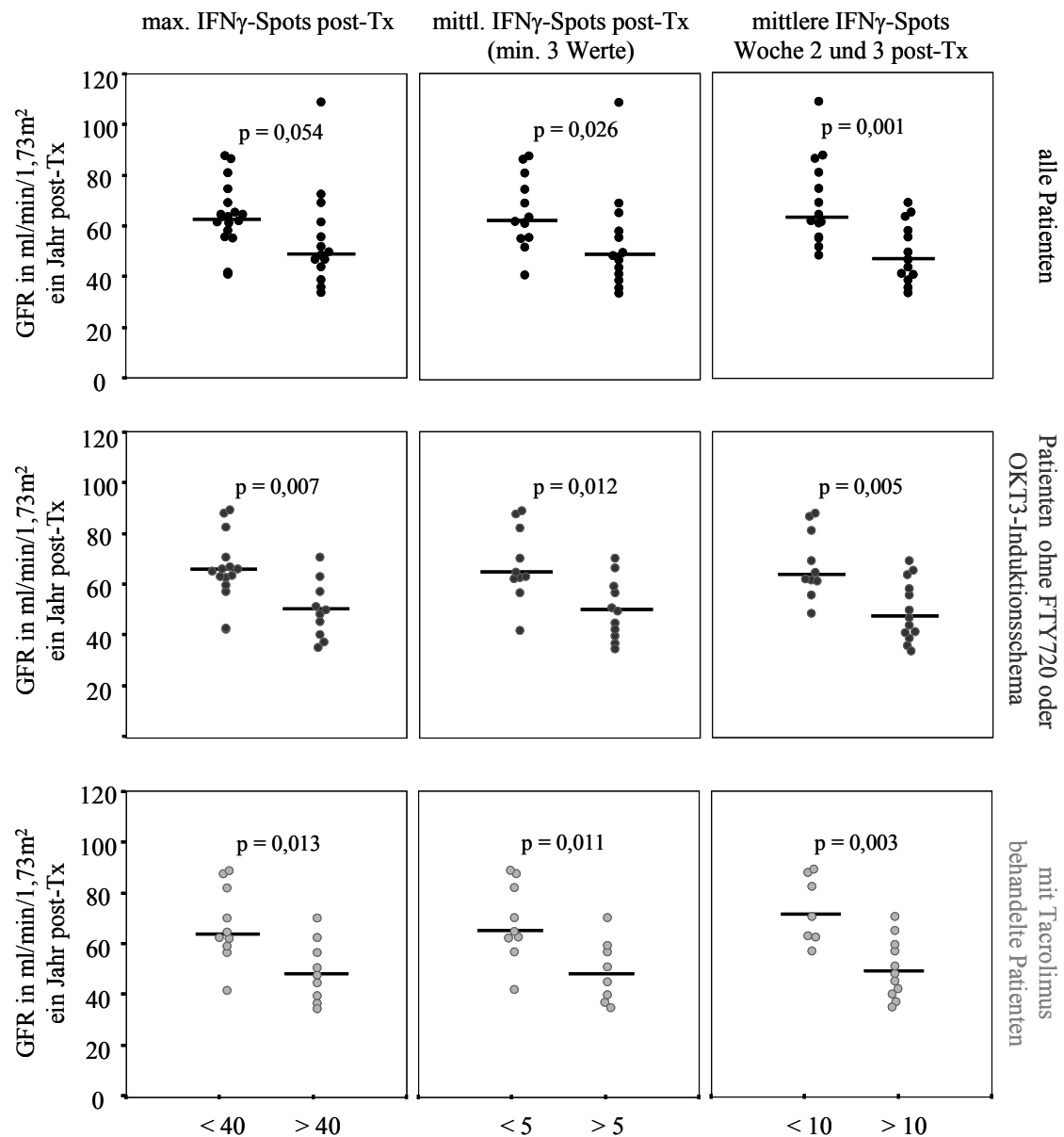


Abbildung 13 Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation bei Patienten OHNE AKUTE REJEKTION mit Werten spenderreaktiver Zellen post-Tx über bzw. unter einem experimentell ermittelten Cut-Off. Die Gruppen unterscheiden sich in ihrem Median (schwarzer Balken) teilweise signifikant.

In der Gruppe der Patienten mit mindestens einer frühen akuten Rejektion ($n = 18$), konnte jedoch keiner dieser Zusammenhänge und auch keine andere signifikante Korrelation zwischen spenderreaktiven, $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen zu irgendeinem Zeitpunkt nach Transplantation und der Nierenfunktion nach Transplantation festgestellt werden. Dies wird auch durch *Abbildung 14* deutlich:

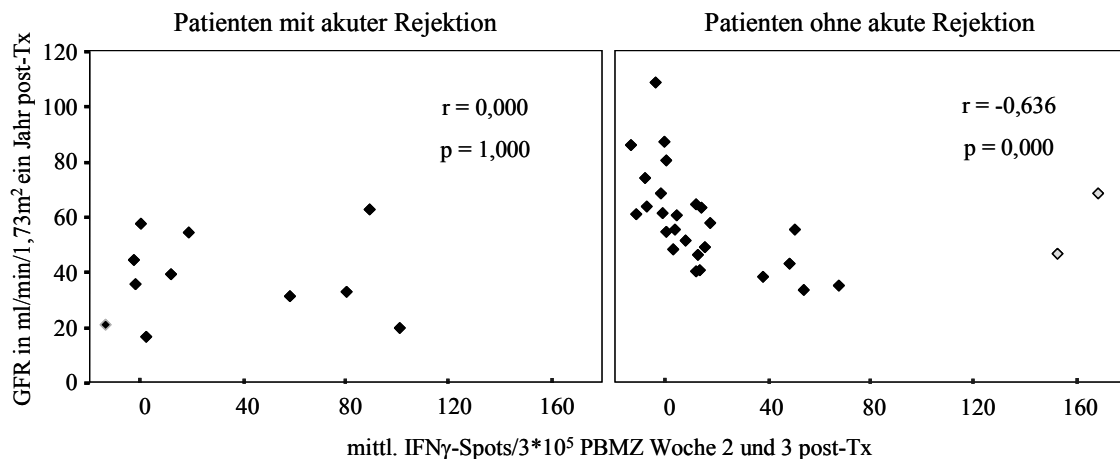


Abbildung 14 Zusammenhang zwischen der Anzahl spenderreaktiver, $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen post-Tx und der Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation bei Patienten mit und ohne Nachweis einer akuten Rejektion. Während bei Patienten mit akuter Rejektion kein Zusammenhang zwischen beiden Parametern besteht, korreliert der Mittelwert der spenderreaktiven Zellen innerhalb der ersten drei Monate gut mit der GFR und dem Serumkreatinin ein Jahr post-Tx. Diese Beziehung ist bis auf zwei Ausnahmen sogar nahezu linear.

Andererseits konnte innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppe kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der maximalen und mittleren Anzahl $\text{IFN}\gamma$ -produzierender Zellen oder der Zellzahl zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Transplantation zwischen Patienten mit akuten Rejektionsepisoden und Patienten ohne nachgewiesene Rejektionen gezeigt werden.

Zusammenhang mit Sensibilisierungsfaktoren

Die Patienten mit den höchsten maximalen (> 140 Spots) und mittleren (> 50 Spots) ELISpot-Werten nach Transplantation wurden vor Transplantation alle mindestens 79 Monate dialysiert. Darunter befanden sich auch drei Patienten mit dem maximalen ELISpot-Wert am Tag 1 post-Tx, die auch Werte über 200 Spots vor der Transplantation hatten und eine akute Rejektion erlitten. Unterhalb dieser Spitzenwerte variierte die Dauer der Hämodialysezeit jedoch erheblich [*Abbildung 15*]:

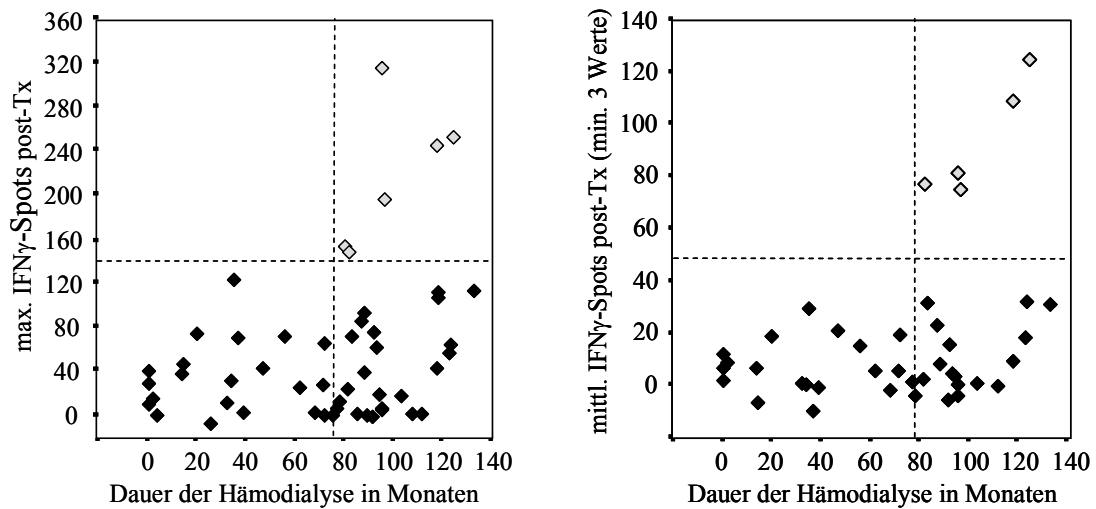


Abbildung 15 Zusammenhang zwischen der Dauer der Hämodialyse und der Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen post-Tx. Patienten mit der größten maximalen oder mittleren Anzahl Zellen wurden insgesamt mindestens 79 Monate hämodialysiert.

Unter den Patienten mit diesen höchsten Werten war vor Transplantation nur bei einer Patientin eine Gravidität aufgetreten, wobei bei dieser Patientin nicht einer der drei höchsten maximalen oder mittleren Werte gemessen wurde.

Bei den zehn Patienten mit der höchsten Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen innerhalb der Wochen 1 und 2 nach Transplantation konnten interessanterweise vor Transplantation nie PRA nachgewiesen werden. Patienten mit den höchsten Zellfrequenzen vor Transplantation, am Tag 1 post-Tx und ab Woche 3 nach Transplantation wiesen hingegen zumindest teilweise PRA vor der Transplantation auf.

In der gesamten Patientengruppe gibt es zwischen den einzelnen Wochenwerten post-Tx und dem HLA-Mismatch mehrere Zusammenhänge. So besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem HLA-A-Mismatch und den ELISpot-Werten der Woche 4 post-Tx, dem HLA-B-Mismatch und den ELISpot-Werten der Woche 2 post TX, dem HLA-DR-Mismatch und den ELISpot-Werten der Wochen 3 und 5 post-Tx, und dem HLA-Gesamt-Mismatch und den ELISpot-Werten der Wochen 2 und 4 post-Tx. Nimmt man jedoch von der Analyse die mit FTY720 behandelten Patienten und die Patienten mit OKT3-Induktionstherapie aus, so ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen allen betrachteten HLA-Mismatchformen und den Werten der Woche 2 post-Tx (für HLA-Gesamt-Mismatch: $r_s = 0,484$; $p = 0,004$; $n = 33$) [Abbildung 16]:

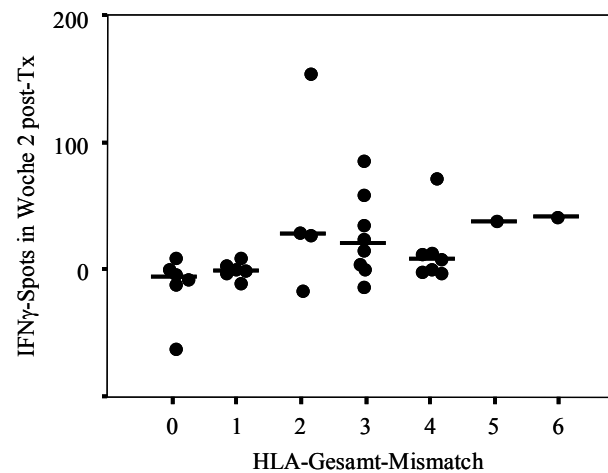


Abbildung 16 Beziehung zwischen dem HLA-Gesamt-Mismatch und der Anzahl der spenderreaktiven Zellen in Woche 2 post-Tx

6.4 Besonderheiten immunsuppressiver Therapieschemata

Patienten, die mit FTY720 behandelt wurden

Sieben der 52 untersuchten Patienten bekamen als Immunsuppression FTY720, Ciclosporin A und Methylprednisolon. Keiner der Patienten hatte zuvor je eine Transplantation bekommen. Bei zwei Patienten kam es zu einer verzögerten Funktionsaufnahme des Organs, wobei FTY720 und Ciclosporin A bei Patient 24 am Tag 4 post-Tx abgesetzt und durch Tacrolimus und MMF ersetzt wurden. Bei Patient 5 kam es innerhalb Woche 1 zu einer schweren akuten Rejektion, die zum Verlust der Organfunktion führte. Hier wurden FTY720 und Ciclosporin sechs Wochen nach Transplantation durch Tacrolimus und MMF ersetzt. Während letzterer einen hohen prä-Tx Wert von über 400 Spots hatte, konnten bei dem ersten 37 Spots vor Transplantation gezählt werden. Beide hatten jedoch einen hohen maximalen Wert nach Transplantation und zwar ersterer am Tag 1 nach Transplantation (62 Spots) und der zweite innerhalb Woche 1 (74 Spots). Bei einem weiteren Patienten kam es innerhalb der ersten sechs Monate nach Transplantation zu einer akuten Rejektion, ohne dass allerdings vor Transplantation noch zu irgendeinem der Messzeitpunkte nach Transplantation spenderreaktive Zellen mittels ELISpot-Assay nachgewiesen werden konnten. Bei einem anderen Patienten, bei dem auch eine Ciclosporintoxizität festgestellt wurde, wechselte man nach sechs Monaten von FTY720 und Ciclosporin auf Tacrolimus und MMF. Eine Patientin mit sieben Schwangerschaften vor Transplantation hatte zu keinem Messzeitpunkt spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen und eine gute Nierenfunktion nach einem Jahr (Serumkreatinin: 0,93

mg/dl, GFR: 74,9 ml/min/1,73m²). Ein Patient mit drei Transfusionen vor Transplantation und historisch gemessenen PRA von max. 60 % wies in dieser Gruppe den höchsten maximalen Wert nach Transplantation auf, allerdings erst in Woche 9 post-Tx. Seine Nierenfunktion betrug nach einem Jahr: Serumkreatinin: 1,5 mg/dl, GFR: 46,7 ml/min/1,73m². Die Einzelheiten sind in *Tabelle 6* zusammengefasst:

Tabelle 6 Sensibilisierungsfaktoren und Transplantationsverlauf der Patienten, die als immunsuppressive Therapie FTY720 erhielten

Pat.- nr.	PRA (%) akt/max	früh. Grav.	früh. Transf.	Dialyse- dauer	Behandl. mit FTY	prä-TX Wert	Prim.- fkt.	max. Spots post-TX	mittl. Spots post-TX	aRX	GFR 1 Jahr post-TX (ml/min/1,73m ²)
5	0/0	0	0	19,5 M	6 W	489,5	n	74	19	j	10
19	0/60	0	3	87 M	1 J	14	j	93,5	8	n	46,7
20	0/0	0	0	110 M	1 J	-7,5	j	1	0	n	55,2
21	0/0	0	2	74 M	6 M	-21	j	0,5	-	n	41,9
22	0/0	7	0	67 M	1 J	-5	j	3	-2	n	74,9
23	0/0	0	0	38 M	1 J	-0,5	j	3	-1	j	45,1
24	0/2	0	0	92 M	4 T	37	n	62	4,5	n	52

Patienten, die eine OKT3-Induktionstherapie erhielten

Bei zwei Hochrisikopatienten mit vorhergehenden Nierentransplantationen, dabei stattgehabten Rejektionen in der Anamnese und mit historischen PRA max von über 70 % wurden vor Transplantation spenderreaktive Zellen entsprechend 29 bzw. 6 Spots gemessen. Die Induktionstherapie bestand aus einer perioperativen Gabe von OKT3, anti-TNF α -mAk, anti-CD20-mAk sowie fünf Plasmapheresen an den darauf folgenden Tagen. Danach wurde zu konventioneller Immunsuppression gewechselt. Trotz hoher maximaler ELISpot-Werte nach Transplantation, die interessanterweise auch eher später auftraten (Patient 17 Monat 7: 278,5 Spots – Patient 16 Woche 11: 107,5 Spots) erlitt keiner der beiden Patienten eine akute Rejektion und beide hatten ein Jahr nach Transplantation eine gute Nierenfunktion (Serumkreatinin: 0,68 mg/dl, GFR: 109,1 ml/min/1,73m² bzw. Serumkreatinin: 0,93 mg/dl, GFR: 72,7 ml/min/1,73m²). Weitere transplantationsspezifische Charakteristika der Patienten sind in *Tabelle 7* aufgelistet:

Tabelle 7 Sensibilisierungsfaktoren und Transplantationsverlauf Transplantationsverlauf der Patienten, die ein OKT3-Induktionsschema erhielten

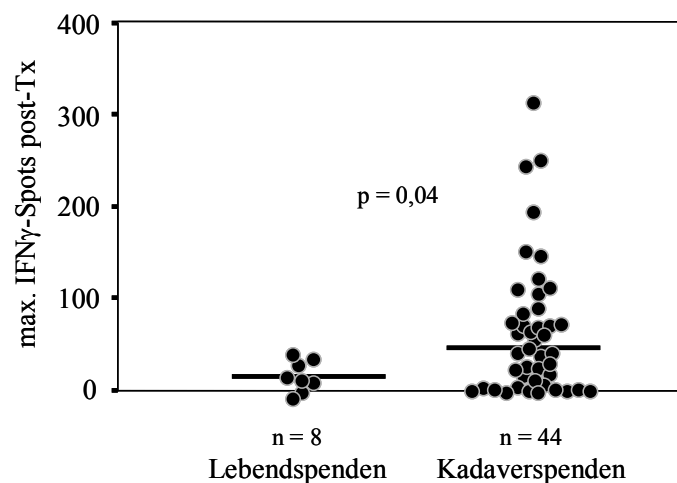
Pat.-nr.	PRA (%) akt/max	früh. Grav.	früh. Transf.	Dialyse- dauer	prä-TX Wert	Prim.- fkt.	max. Spots post-TX	mittl. Spots post-TX	aRX	GFR 1 Jahr post-TX (ml/min/1,73m ²)
16	20/87	0	3	117 M	6	-	107,5	-	n	72,7
17	0/76	1	0	121 M	29	n	57,5	18	n	109,1

Patienten, die eine Lebendspende erhielten

Acht der insgesamt 52 untersuchten Patienten erhielten eine Niere von einem Lebendspender und wurden mit anti-IL2R-mAk (Basiliximab), Ciclosporin A, MMF und Steroiden behandelt. Da eine immunsuppressive Therapie bei dem Großteil der Lebendspenden schon längere Zeit vor Transplantation organisatorisch möglich ist, gelang es nur bei drei Patienten einen Wert der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen vor Transplantation ohne Einwirkung von Immunsuppressiva zu bestimmen, wobei jeweils keine Zellen nachgewiesen werden konnten. Die maximalen ELISpot-Werte nach Transplantation lagen zwischen 0 und 41 Spots. Zwei der Patienten erlebten eine frühe akute Rejektion, einer der Patienten sogar zweimal. Nur bei einem Patienten nahm das Organ seine Funktion erst verspätet auf. Weitere transplantationsspezifische Charakteristika der Patienten werden in *Tabelle 8* zusammengefasst. Zwar gab es eine signifikante positive Korrelation zwischen den ELISpot-Werten der Woche 2 nach Transplantation mit dem Serumkreatinin nach sechs Monaten ($r_s = 0,775$; $p = 0,041$; $n = 7$), sonst konnte allerdings zwischen der Nierenfunktion nach einem Jahr oder dem Auftreten einer Rejektion und den maximalen und mittleren Werten, sowie zwischen den spenderreaktiven Zellen vor und nach Transplantation und dem HLA- Mismatch oder der CMV-Serologie von Spender und Empfänger kein Zusammenhang gezeigt werden. Im Vergleich zu der Gruppe der Patienten mit Kadaverspenden zeigte sich jedoch, dass Patienten mit Lebendspenden signifikant weniger spenderreaktive Zellen in Woche 3 aufwiesen ($p = 0,038$) und signifikant niedrige maximale Frequenzen post-Tx als Patienten mit Kadaverspenden erreichten ($p = 0,04$) [Abbildung 16].

Tabelle 8 Sensibilisierungsfaktoren und Transplantationsverlauf der Patienten, die eine Lebensspende erhielten

Pat.- nr.	PRA(%) akt/max	früh. Grav.	früh. Transf.	Dialyse- dauer	früh. TX.	prä-TX Wert	Prim.- fkt.	max. Spots post-TX	mittl. Spots post-TX	aRX	GFR 1 Jahr post-TX (ml/min/1,73m ²)
25	0/0	0	2	25 M	n	-10	j	-7	-	n	64,5
26	0/0	0	0	31,5 M	n	-	j	12	1	j	40,3
27	0/0	0	0	0 M	n	-10,5	j	10,5	1,5	n	62
28	0/0	0	0	13 M	n	-4,5	j	37,5	6,25	j	55,4
29	0/0	0	0	0 M	n	-	j	41	6,5	n	48,7
30	0/0	0	0	1,5 M	n	-	j	15,5	8,5	n	65,3
31	0/0	0	0	0 M	n	-	j	29	12	n	41,2
32	0/0	0	-	3 M	j,Herz	-	n	0	-	n	64,6

**Abbildung 17** Maximale Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen nach Transplantation bei Patienten mit Lebendspenden und bei Patienten mit Kadaverspenden.

6.5 Versuch der Optimierung des ELISpot-Assays

Reproduzierbarkeit

15 Probanden wurden in verschiedenen Kombinationen auf gegenseitige Alloreaktivität untersucht. Dabei wurden je $3 \cdot 10^5$ PBMZ von je zwei Probanden im Dreifachansatz im ELISpot-Assay miteinander inkubiert, die jeweiligen durch Alloreaktion entstandenen IFN γ -Spots der Reaktionspartner gemessen und daraus der Variationskoeffizient

(=Standardabweichung/Mittelwert) der Dreifachansätze bestimmt. Außerdem wurden von einem CMV-seropositiven Probanden mit bekannter T-Zell-Reaktion auf das CMV-pp65-Peptidgemisch PBMZ zu je $2 \cdot 10^5$ /Well und je $5 \cdot 10^4$ /Well in je zehn Ansätzen auf zehn verschiedenen Platten mit CMV-pp65-Peptidgemisch stimuliert und die Platten getrennt entwickelt. Der Variationskoeffizient der verschiedenen PBMZ-Konzentrationen zwischen den zehn Wells und zwischen den Mittelwerten der zehn Platten wurde bestimmt.

Je nach Höhe der Alloreaktivität schwankten die Variationskoeffizienten der Dreieransätze. Bei Antworten bis durchschnittlich 20 Spots lag der Mittelwert des Variationskoeffizienten bei 0,28 mit einer Spanne von 0,07 bis 0,5; bei Antworten zwischen durchschnittlich 20 Spots und 100 Spots gab es einen mittleren Koeffizienten von 0,22 mit einer Spanne von 0,07 bis 0,74; und bei Antworten über durchschnittlich 100 Spots ergab sich bei einem mittleren Variationskoeffizienten von 0,13 eine Spanne von 0,03 bis 0,56. Die Variationskoeffizienten der CMV-Peptid-Stimulation lagen bei den Zehneransätzen mit $2 \cdot 10^5$ PBMZ zwischen 0,04 und 0,19; im Mittelwert bei 0,08; mit $5 \cdot 10^4$ PBMZ zwischen 0,15 und 0,28; im Mittelwert bei 0,21. Die Variationskoeffizienten der Mittelwerte der Zehneransätze der zehn Platten lagen mit $2 \cdot 10^5$ PBMZ bei 0,25; mit $5 \cdot 10^4$ PBMZ bei 0,42.

Ciclosporin A

PBMZ von CMV-seropositiven Probanden mit einer aus durchflusszytometrischen Versuchen einer anderen Arbeitsgruppe des Labors bekannten T-Zell-Reaktion auf CMV-pp65-Gesamtpeptidgemisch wurden in Medium für 30 min, 60 min, 90 min, 120 min und 24 h mit Ciclosporin A inkubiert, danach zweimal gewaschen und mit dem CMV-pp65-Gesamtpeptidgemisch im ELISpot-Assay stimuliert. Bei keinem der Ansätze konnte eine Verminderung der Spotanzahl im Vergleich zu unbehandelten PBMZ, also eine Hemmung der IFN γ -Produktion der Zellen, beobachtet werden.

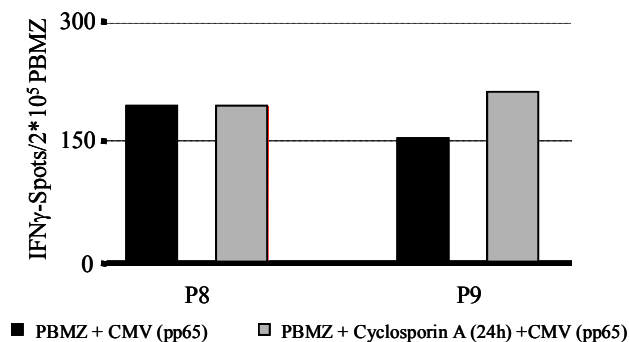


Abbildung 18 IFN γ -Sekretion CMV-spezifischer T-Zellen nach 24h Ciclosporin A-Wirkung

Tacrolimus

Der gleiche Versuch wurde ebenfalls mit PBMZ CMV-seropositiver Probanden mit Tacrolimus durchgeführt. Dabei zeigte sich eine deutliche Hemmung der IFN γ -Produktion der CMV-reaktiven Zellen durch eine Abnahme der IFN γ -Spots im Vergleich zum unbehandelten Ansatz.

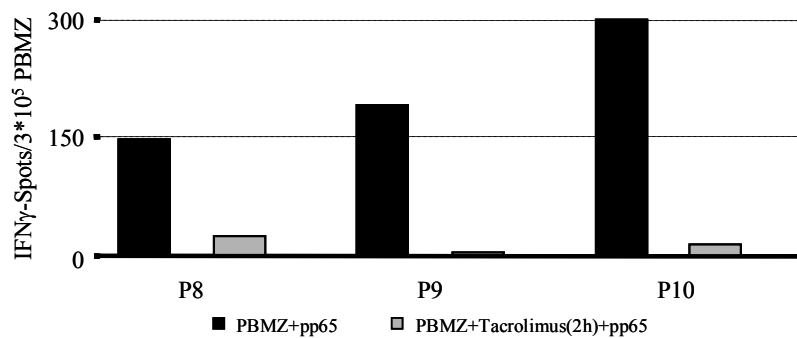


Abbildung 19 IFN γ -Sekretion CMV-spezifischer T-Zellen nach 2h Tacrolimus-Wirkung

Behandelte man nun allerdings PBMZ von CMV-negativen Probanden, die bisher keine CMV-spezifische T-Zell-Reaktion aufgebaut haben konnten mit Tacrolimus für 2 h, wusch sie danach zweimal und inkubierte sie zusammen im ELISpot-Assay mit unbehandelten PBMZ von CMV-seropositiven Probanden, die zusätzlich mit CMV-pp65-Peptidgemisch stimuliert wurden, so zeigte sich auch hier eine markante Hemmung der IFN γ -Sekretion der CMV-spezifischen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unbehandelten PBMZ seronegativer Probanden (der alloreaktive Background wurde abgezogen). Das spricht dafür, dass Tacrolimus von den behandelten PBMZ seronegativer Probanden auf die unbehandelten PBMZ seropositiver Patienten während der Inkubationszeit überging, dass Tacrolimus sich also nicht vollständig auswaschen ließ.

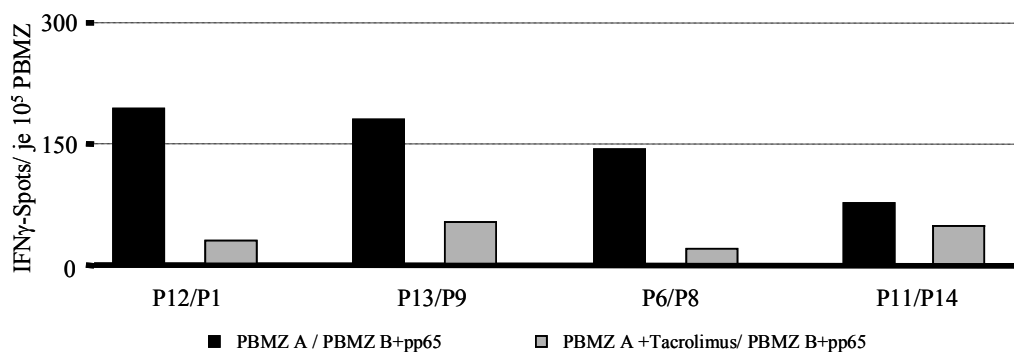


Abbildung 20 Übertragung der Wirkung von Tacrolimus auf unbehandelte CMV-spezifische T-Zellen

CD2^{pos}-Zelldepletion

Das CD2-Antigen befindet sich auf T-Zellen, Thymozyten und natürlichen Killerzellen. Durch Markierung der CD2 Moleküle mit magnetischen CD2-Antikörpern konnten die IFN γ -produzierenden T- und NK-Zellen aus präparierten PBMZ oder Splenozyten mittels einer aus Eisenkügelchen bestehenden Säule in einem Magnetfeld (MACS) entfernt, also depletiert werden. Nach der Depletion waren konstant weniger als 2 %, meist weniger als 1 % der behandelten Zellen T-Zellen, wie man im Durchflusszytometer anhand von über 20 Messungen zeigen konnte. CD2-depletierte PBMZ ließen sich im Gegensatz zu nichtdepletierten nicht mit PHA stimulieren, das heißt es erfolgte keine IFN γ -Produktion durch T-Zellen, da diese so gut wie vollständig eliminiert worden waren.

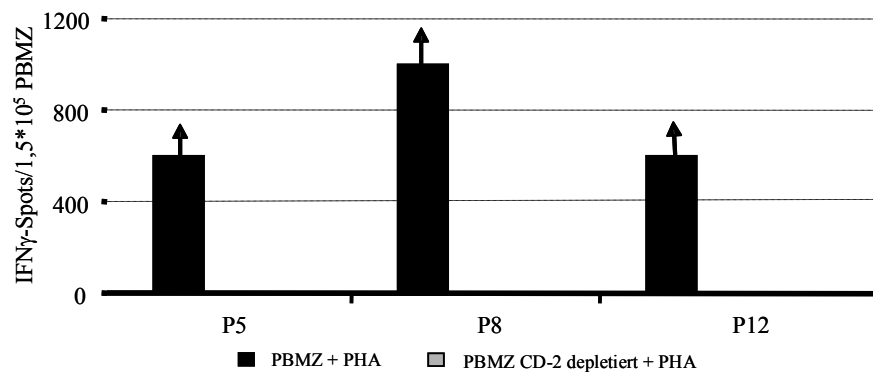


Abbildung 21 IFN γ -Sekretion CD2-depletierter Leukozyten unter PHA-Stimulation

Die zweite Frage war, ob die so behandelten Zellen noch Antigenität besitzen, das heißt, ob die verbliebenen antigenpräsentierenden Zellen noch in der Lage sind, die T-Zellen der Responderzellen zu aktivieren, welche dann IFN γ produzieren. Dazu wurden wechselseitig CD2-depletierte und die nichtdepletierten PBMZ von Probanden mit bekannter, starker, gegenseitiger alloreaktiver Reaktion im ELISpot-Assay miteinander inkubiert. Die gemessenen IFN γ -Spots kamen durch die T-Zell-Alloreaktion beider Probanden zustande.

Während die CD2-depletierten PBMZ weiterhin in der Lage waren, alloreaktive Zellen des anderen Probanden im ELISpot-Assay zu aktivieren, hing die Anzahl der IFN γ -Spots davon ab, welcher Reaktionspartner CD2-depletiert wurde. Die Depletion führte zu einer Anreicherung von antigenpräsentierenden Zellen, wodurch sich bei gleicher Zellzahl im ELISpot-Assay die Konzentration der antigenpräsentierenden Zellen erhöhte und damit die Stimulation der T-Zellen des Responders verstärkte, welche dann eine stärkere alloreaktive Antwort zeigten. Im Gegenzug führte eine T-Zell-Depletion der PBMZ desjenigen Reaktionspartners mit der

ursprünglich stärkeren alloreaktiven Antwort zu einer insgesamt schwächeren Antwort. Wurden die PBMZ beider Reaktionspartner CD2-depletiert, wurde keine Alloantwort beobachtet.

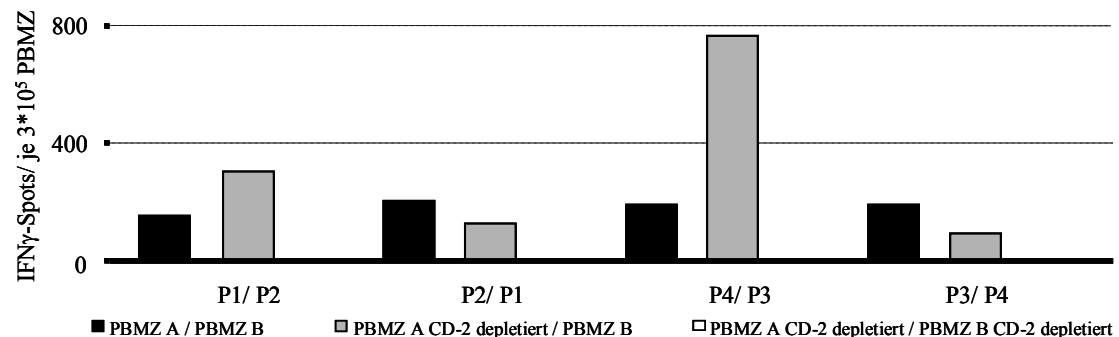


Abbildung 22 Aktivierung alloreaktiver T-Zellen durch CD2-depletierte allogene Leukozyten

Bestrahlung

Mit der Methode der magnetischen CD2^{pos}-Zelldepletion ist nun ein Verfahren etabliert worden, das effektiv die IFN γ -Produktion von T-Lymphozyten der Spenderzellen inhibiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte nun auch überprüft werden, welchen Einfluss die in der Patientenstudie verwendete Bestrahlung der Spendersplenozyten mit 30 Gray tatsächlich auf die Antigenität der antigenpräsentierenden Zellen und die IFN γ -Sekretion der Spender-T-Lymphozyten hatte. Dafür wurden PBMZ von drei Probanden teils bestrahlt, teils nicht bestrahlt und mit Spendersplenozyten, die mittels MACS CD2^{pos}-depletiert und ebenfalls teils bestrahlt und teils unbestrahlt waren, in verschiedenen Ansätzen miteinander inkubiert. Der Anteil der T-Zellen in den PBMZ der Probanden wurde vorher durchflusszytometrisch gemessen. Pro Well wurden $3 \cdot 10^5$ T-Zellen eingesetzt - die Anzahl der PBMZ war dementsprechend größer.

Der Versuch zeigte, dass tendenziell weniger Zellen der Probanden-PBMZ nach Bestrahlung mit 30 Gray auf den Stimulus der allogenen Splenozyten hin IFN γ bildeten, dass Bestrahlung zumindest teilweise die IFN γ -Sekretion hemmen konnte. Diese Hemmung ist jedoch nicht signifikant, und für die gegebene Fragestellung nicht ausreichend. Auf der anderen Seite konnten bestrahlte, CD2^{pos}-depletierte Splenozyten die Zellen der Probanden-PBMZ mindestens genauso gut stimulieren wie unbestrahlte.

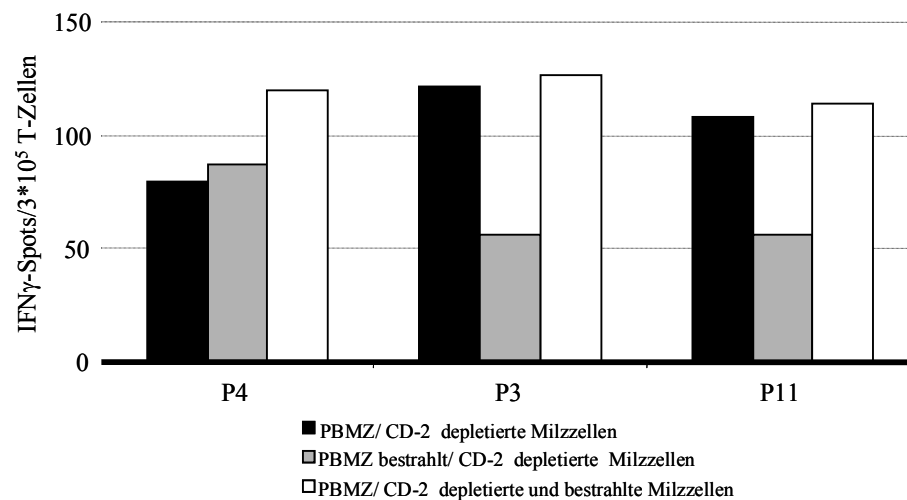


Abbildung 23 IFN γ -Sekretion (nach allogenem Stimulus) und Allogenität bestrahlter Leukozyten

Anteil der T-Zellen an Responder-PBMZ

Um die Frage zu beantworten, inwieweit der Anteil der T-Zellen an PBMZ zwischen verschiedenen Messzeitpunkten und zwischen verschiedenen Patienten variiert und ob es daher gerechtfertigt ist, eine bei jeder Messung konstante Anzahl von nicht näher definierten Responder-PBMZ im ELISpot-Assay einzusetzen, wurde der prozentuale Anteil der T-Zellen an PBMZ von 15 nierentransplantierten Patienten außerhalb der durchgeführten Studie vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation bestimmt. Zusätzlich wurde der Anteil der verbliebenen Granulozyten gemessen, die theoretisch durch die Präparation der PBMZ entfernt werden.

Dabei zeigte sich, dass der T-Zell-Anteil sowohl zwischen den Patienten zu gleichen Zeitpunkten als auch innerhalb eines Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Transplantation stark variierte. Während z. B. prä-Tx bei den verschiedenen Patienten ein T-Zell-Anteil zwischen 18 % und 62 % gemessen werden konnte, schwankte er post-Tx bei einem Patienten zwischen 6 % und 27 %, bei einem anderen zwischen 0,6 % und 29 %. Obwohl der Anteil der Granulozyten wie erwartet meist unter 5 % lag, so erreichte er in Einzelfällen 20 % und 30 %.

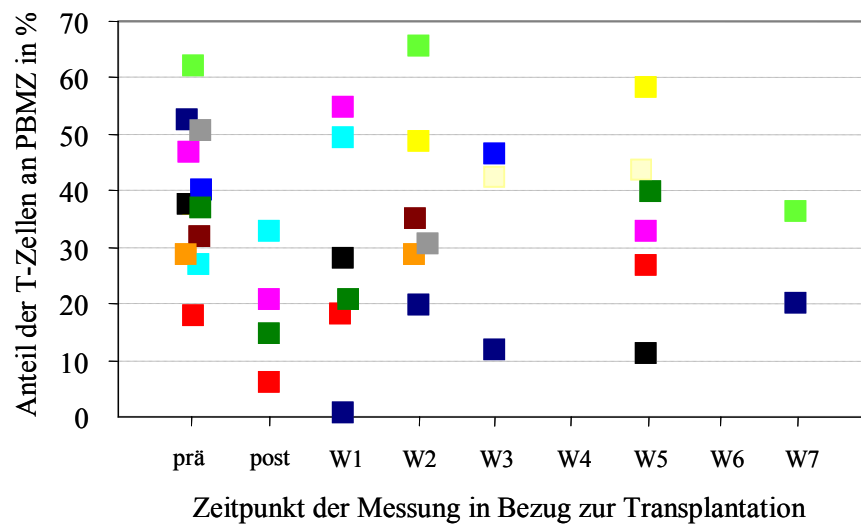


Abbildung 24 Prozentualer Anteil von T-Zellen an PBMZ nierentransplantierter Patienten zu verschiedenen Messzeitpunkten vor und nach Nierentransplantation. Die einzelnen Patienten werden durch unterschiedliche Farben symbolisiert.

Optimale Zellkonzentrationen

Der Zusammenhang zwischen der Konzentration antigenpräsentierender Zellen und alloreaktiver T-Zellen und der Anzahl der IFN γ -Spots im ELISpot-Assay wurde anhand von zwei Probanden untersucht. PBMZ der Probanden wurden in verschiedenen Konzentrationen mit CD2^{pos}-depletierten Zellen einer frisch präparierten Spendermilz in ebenfalls verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Dabei war die Anzahl der eingesetzten T-Zellen der Responder-PBMZ durch die durchflusszytometrische Messung des Anteils der T-Zellen an den PBMZ bekannt. Die CD2^{pos}-Zelldepletion der Milzzellen führte zu einer fast vollständigen Elimination der vorher enthaltenen T-Zellen, da jene danach in keiner Konzentration mit PHA zu einer IFN γ -Produktion zu stimulieren waren. Die IFN γ -Spots stammten daher ausschließlich von den T-Zellen der Probanden.

Der Versuch zeigte, dass die T-Zell-Antworten bei konstanter Anzahl der stimulierenden CD2-depletierten Milzzellen, wie erwartet, nahezu linear von der Anzahl der eingesetzten T-Zellen der Probanden abhing. Allerdings stieg die Höhe der Antwort ebenfalls bei konstanter Anzahl der Responder-T-Zellen aber wachsender Anzahl der eingesetzten stimulierenden Milzzellen:

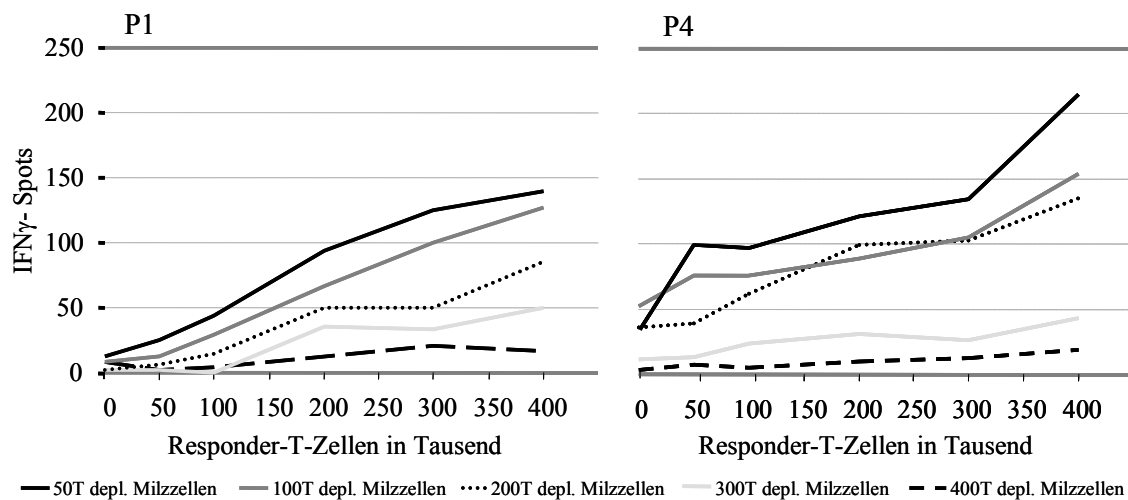


Abbildung 25 IFN γ -Spots im ELISpot Assay bei T-Zell-Alloreaktionen im Zusammenhang mit der Anzahl der Stimulator- und Responderzellen

In einem ähnlichen Experiment, in dem die PBMZ der Probanden jedoch nicht mit Milzzellen, sondern mit den CD2-depletierten PBMZ des jeweils anderen Probanden stimuliert wurden, konnte man bei konstanter Zahl der Responder-T-Zellen ab einer gewissen Stimulatorzellkonzentration einen Sättigungseffekt beobachten, wobei ein weiterer Anstieg der Anzahl der eingesetzten Stimulatorzellen zu keiner weiteren Erhöhung der alloreaktiven Antwort führte.

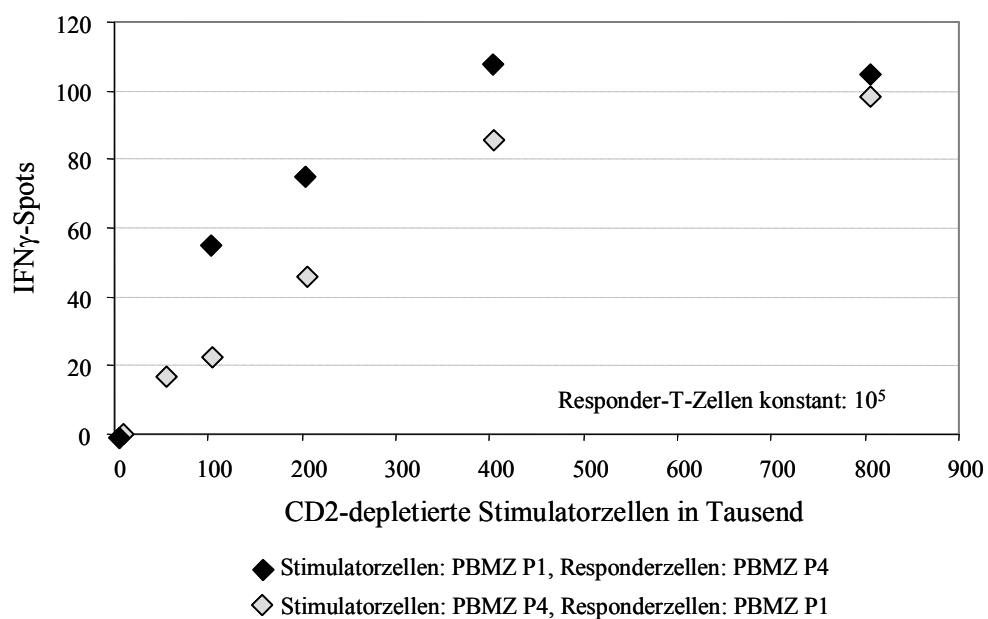


Abbildung 26 Die alloreaktive T-Zell-Antwort konvergiert bei einer sättigenden Stimulation

In beiden Experimenten wurden teilweise über eine Mio. Zellen pro Well eingesetzt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im ELISpot-Assay weit über $6 \cdot 10^5$ Zellen pro Well eingesetzt werden können ohne die Vitalität der Zellen und das Messergebnis zu gefährden. Zusätzlich scheint ein Verhältnis Responderzellen: Stimulatorzellen von 1:1 wie im ELISpot-Protokoll in Anlehnung an das Verfahren der MLR beschrieben nicht die gesamte alloreaktive Antwort zu erfassen.

7 Diskussion

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit die eingangs gestellte Frage nach der klinischen Bedeutung der im ELISpot-Assay gemessenen spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen von nierentransplantierten Patienten folgendermaßen beleuchtet werden: Bereits vor Transplantation konnte mit Hilfe des Assays eine Gruppe von Patienten mit früher akuter Rejektion ihres Organs identifiziert werden; nach Transplantation konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl spenderreaktiver Zellen im peripheren Blut, besonders in Woche 2 und 3 und bei Patienten ohne frühe akute Rejektion, und der Nierenfunktion ein Jahr nach Transplantation festgestellt werden, wobei der HLA-Mismatch und die Art der Spende einen Einfluss auf die Anzahl der gemessenen Zellen zu haben schien. Zur Beantwortung der Frage nach einer methodischen Optimierung des Assays konnten Aussagen über die einzusetzenden Zellkonzentrationen und die Inhibition der IFN γ -Sekretion durch die Stimulatorzellen beige-steuert werden. Der Variationskoeffizient des Assays, der bis zu 42 % betrug, könnte demnach durch eine Erhöhung und Standardisierung der verwendeten Anzahl der Responder-T-Zellen sowie durch den Einsatz von Stimulatorzellen im Überschuss, aus welchen zuvor alle CD2^{pos} Leukozyten entfernt wurden, verringert werden.

7.1 Bewertung der angewandten Methodik

Bestimmung spenderreaktiver Zellen in PBMZ

Die Bestimmung spenderreaktiver Zellen in PBMZ stellte insofern eine interessante Aufgabe dar, als dass PBMZ in relativ großer Menge (etwa eine Million Zellen/ml venöses Blut) in kurzen Zeitabständen ohne Risiko einer Schädigung des Transplantats mit der im Vergleich zur Nierenbiopsie „noninvasiven“ Technik der peripheren Punktion einer Vene gewonnen werden können, wobei für den Patienten nur geringstmögliche Unannehmlichkeiten bestehen. Damit existieren ideale Voraussetzungen für ein immunologisches Monitoring, welches zu jedem gewünschten Zeitpunkt Auskunft über die jeweilige Immunaktivierung gegen das Transplantat geben könnte.

Heeger et al. hatten zwar über einen Zusammenhang zwischen spenderreaktiven Gedächtniszellen im Blut vor Transplantation und dem Auftreten von akuten Rejektionen berichtet [95], es stellte sich jedoch die Frage, ob sich dies in einer anderen Patientengruppe

reproduzieren lässt und ob sich der Blutkreislauf auch nach Transplantation als geeignetes Kompartiment zur Messung spenderreaktiver Zellen erweist oder ob die jetzt zu betrachtenden schon geprimten und aktivierten Effektor-T-Zellen durch im Gegensatz zu naiven T-Zellen vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (LFA1, VLA4) oder Chemokinrezeptoren (CCR1, CCR2, CCR5, CXCR Chemokinrezeptor) [97] nicht viel eher im Transplantat akkumulieren, während sie im Blut eine Frequenz unterhalb der Nachweisgrenze aufweisen.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen auch nach Transplantation und unter Immunsuppression im ELISpot-Assay nachweisbar sind. Zusätzlich konnte für einige Patienten kurz vor oder während einer akuten Rejektion des Transplantats ein Anstieg der spenderreaktiven Zellen beobachtet werden und ein generell erhöhtes Niveau war mit einer eingeschränkten Nierenfunktion ein Jahr post-Tx assoziiert. Die Messung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen in PBMZ mittels des ELISpot-Assays erscheint diesbezüglich als zukünftige Methode des Immunmonitoring nierentransplanterter Patienten geeignet.

Stellenwert des ELISpot-Assays

Das ELISpot-Assay wird vielseitig unter anderem für das Monitoring antigenspezifischer Immunantworten im Kontext der Vakzinenentwicklung, Krebs- und Autoimmunitätsforschung verwendet [98, 99, 100]. Der im Gegensatz zum LDA-Verfahren relativ geringe Arbeitsaufwand und die vom jeweils zu bestimmenden Zytokin abhängende kurze Dauer des Assays bieten zusammen mit der hohen Sensitivität mit einer Detektionsschwelle von weniger $1/10^6$ Zellen unübersehbare Vorteile, die vor allem für das routinemäßige Immunmonitoring transplanterter Patienten von Bedeutung sein könnten. Demgegenüber stehen allerdings nicht zu vernachlässigende Einschränkungen: Im Gegensatz zu durchflusszytometrischen Messungen z.B., können mit dem ELISpot-Assay keine Aussagen über den Phänotyp der untersuchten Zellen, deren Subpopulationen und weiteren Funktionen getroffen werden, da in einem Ansatz neben dem gemessenen Zytokin keine weiteren Zytokine oder Oberflächenmarker erfasst werden können.

Obwohl in einigen Studien eine Korrelation zwischen der Anzahl der Zellen gemessen im ELISpot-Assay und der von Vorläuferzellen gemessen mittels LDA anhand mehrerer Effektorfunktion gefunden wurde[101], so ließ die Reproduzierbarkeit des in dieser Arbeit verwendeten Verfahrens zu wünschen übrig. Während die Messung antigenspezifischer T-Zellen (CMV) zwischen einzelnen Wells bei hohen T-Zell-Antworten durchschnittlich einen

Variationskoeffizienten von 8 %, bei niedrigen 21 % ergab, so variierten die Antworten auf verschiedenen 96-Well-Platten bei hohen Antworten um 25 %, bei niedrigen um 42 %. Das aber bedeutet einen Unterschied zwischen zwei theoretisch gleichen Ansätzen von mehr als 100 % ! Bei der Messung alloreaktiver T-Zellen betrug der Variationskoeffizient innerhalb der einzelnen Wells zwischen 28 % und 13 %. Bei einem niedrigen Cut-Off von 10 bzw. 40 Spots, wie er sich hier für die Messung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen für Woche zwei und drei bzw. dem maximalen Wert post-Tx als günstig erwies, wäre das von entscheidender Bedeutung. Die Arbeitsgruppe um Heeger et al., die das Assay ebenfalls auf Reproduzierbarkeit getestet hat, kommt auf ähnliche Ergebnisse [102]. In einer von ihnen durchgeführten Analyse der Reproduzierbarkeit alloreaktiver T-Zell-Antworten in Nierentransplantierten mit stabiler Nierenfunktion wurden Abweichungen zwischen den Messwerten verschiedener Untersucher von bis zu 27 % beobachtet. Da der Fehler einer Messung durch genügend Ansätze in den Hintergrund tritt, hat die Verbesserung der Intra-Assay-Reproduzierbarkeit Vorrang.

Ein weiterer Nachteil des ELISpot-Assays besteht in der fehlenden Vergleichbarkeit der Werte zwischen verschiedenen Laboren. Trotz computergestützter Analyse herrscht ein großes Maß an Subjektivität bezüglich der Interpretation der Spotanzahl, da die vielen vom Benutzer gewählten Analysebedingungen wie Empfindlichkeit, Helligkeit, Gradient, Kontrast, Spottrennbarkeit und Spotgröße nicht standardisiert sind.

Versuch der Optimierung des Assays

Einfluss von Bestrahlung mit 30 Gray

Die Bestrahlung von Stimulatorzellen hat sich im MLR-Verfahren hinsichtlich verlässlicher Proliferationsinhibition bewährt. Trotzdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sie auch einen hemmenden Einfluss auf die IFN γ -Sekretion durch PBMZ besitzt, so war dieser doch zu gering um sicher zu sein, dass die im ELISpot-Assay gemessene Zytokinsekretion ausschließlich von Responderzellen stammt. Dies ist jedoch wichtig, da bei der Nierentransplantation vorrangig die Immunantwort des Transplantatempfängers gegen das Transplantat von Interesse ist. Weiterhin fiel eine erhöhte spontane Produktion von IFN γ durch unstimulierte, bestrahlte Zellen auf. Diese wurde ebenfalls von Heeger et al. [1] beschrieben und von Galdiero et al. als dosisabhängiger Effekt der γ -Bestrahlung auf die Zytokinproduktion von Lymphozyten charakterisiert [103]. Durch die Erhöhung der Leerwerte nach Bestrahlung kam es teilweise zu negativen Werten spenderspezifischer T-Zellfrequenzen, was einen

weiteren Nachteil der Bestrahlung von Stimulatorzellen bedeutet, die deshalb in keinem weiteren ELISpot-Assay dieser Art mehr Anwendung finden sollte.

Zelldepletion

Da nach theoretischen Überlegungen vor allem T- und NK-Zellen für eine IFN γ -Sekretion der Stimulatorzellen verantwortlich sind, konnte in dieser Arbeit durch Depletion CD2^{pos} T- und NK-Zellen mit Hilfe magnetischer Antikörper eine Stimulatorzellpopulation generiert werden, die in Folgeuntersuchungen tatsächlich weder auf Antigenstimulation mit PHA noch auf Alloantigenstimulation eine IFN γ -Produktion zeigte. Somit ist davon auszugehen, dass nach Stimulation mit derartig generierten Spenderzellen jeder IFN γ -Spot im ELISpot-Assay von einer Responderzelle stammte.

T-Zell-Anzahl

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen von PBMZ nierentransplanterter Patienten wurde deutlich, dass der Anteil der T-Zellen an PBMZ von Patient zu Patient differiert und auch innerhalb eines Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Transplantation starken Schwankungen unterworfen ist. Schwankungen des T-Zellanteils in PBMZ, die z.B. durch Tageszeit, Stress und Entzündungen beeinflusst werden, sind auch bei Normalprobanden zu beobachten. Sie werden können jedoch durch einige Immunsuppressiva verstärkt werden. Das Immunsuppressivum FTY720 beschleunigt das chemokinabhängige Lymphozyten-Homing in sekundäre lymphatische Organe. Der T-Zell-Antikörper OKT3 führt in Dosierungen einer Antirejektionstherapie über die Induktion von Apoptose in bereits vorher aktivierten Zellen und die Opsonierung von T-Zellen mit anschließender Phagozytose in der Leber zu einer biologischen T-Zell-Depletion. Eine funktionelle T-Zell-Depletion aus dem Blut wirkt über die Internalisierung des OKT3-T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Diese T-Lymphopenie ist allerdings reversibel und wird innerhalb einiger Wochen wieder ausgeglichen. Ein weiteres Problem stellte bei einzelnen nierentransplantierten Patienten ein erhöhter Granulozytenanteil der PBMZ dar. Für eine bessere Reproduzierbarkeit der Werte für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen, für die Ermöglichung eines direkten Vergleichs des zellulären immunologischen Aktivierungszustands zweier Patienten oder innerhalb eines Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten und für die Bildung eines Cut-Offs, der klinisch relevante Werte von Normalwerten sicher unterscheiden kann, sollte eine Standardisierung der Anzahl der als Responderzellen verwendeten T-Zellen angestrebt werden. Dies könnte z.B. durch die durchflusszytometrische

Messung des T-Zell-Anteils vor jedem Einsatz von PBMZ im ELISpot-Assay und der Einstellung der verwendeten PBMZ auf eine bestimmte Anzahl von T-Zellen erfolgen.

Gesamtzellkonzentration

Die durchgeführten Zellzahl-Optimierungsversuche haben außerdem gezeigt, dass die Stimulatorzellen für die vollständige Erfassung der alloreaktiven T-Zell-Alloantwort im ELISpot-Assay nicht - wie bei der MLR - im Verhältnis 1:1 zu den Responderzellen sondern im Überschuss eingesetzt werden sollten. Das optimale Verhältnis zwischen Stimulatorzellen und Responderzellen muss aber möglicherweise für zukünftige Studien erneut austitriert werden, da Spender-PBMZ und Spendersplenozyten eine unterschiedliche Zellzusammensetzung aufweisen.

Um eine Erhöhung der Anzahl der Responder- und Stimulatorzellen im Assay, und damit eine Verstärkung der Alloantwort zu ermöglichen ohne diese durch die limitierte Nährstoffmenge des Mediums einzuschränken, könnte eine zusätzliche Depletion von Monozyten und B-Zellen aus den Responder-PBMZ - z.B. ebenfalls mit Hilfe magnetischer Antikörper – hilfreich sein. Zwar hat sich eine Zellkonzentration von mehr als einer Million Zellen pro Well noch nicht als kritisch erwiesen; trotzdem könnte man spekulieren, dass Monozyten und B-Zellen aus den Empfänger-PBMZ den Boden des Wells unnötig bedecken und zu wenig Platz für alle Empfänger-T-Zellen lassen, deren sezerniertes IFN γ nicht am Boden des Wells gebunden werden kann.

Fazit

Für weitere Studien sowie den Einsatz bei patientenbezogenen klinischen Fragestellungen erscheint die folgende Modifikation des ELISpot-Assays zur Messung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen nötig:

- Eine Bestrahlung der Spenderzellen vor dem Einsatz im ELISpot-Assay sollte vermieden werden.
- Um eine eindeutige Zuordnung der IFN γ -Spots im ELISpot-Assay zu den Empfängerzellen zu erlauben, sollte eine magnetische CD2^{pos}-Zelldepletion von T- und NK-Zellen aus den Spendersplenozyten oder Spender-PBMZ durchgeführt werden.

- Um eine bessere Vergleichbarkeit der Werte zwischen verschiedenen Zeitpunkten prä- und post-Tx und zwischen verschiedenen Patienten zu erreichen, sollte eine Standardisierung der im Assay eingesetzten Anzahl von Empfänger-T-Zellen erfolgen.
- Eine generell größere Anzahl Empfängerzellen pro Well verstärkt die Alloantwort. Da höhere Antworten im ELISpot-Assay einen erheblich niedrigeren Variationskoeffizienten aufweisen, könnte die Reproduzierbarkeit des Assays auf diese Weise womöglich wesentlich verbessert werden. Eine Erhöhung der Gesamtzellkonzentration auf über eine Million pro Well ist zulässig, gefährdet die Vitalität und Funktionalität der Zellen nicht und sollte daher erfolgen.
- Spenderzellen sollten, soweit möglich, immer im Überschuss eingesetzt werden, um stets die vollständige T-Zell-Alloantwort zu erfassen.
- Eine zusätzliche Depletion von Monozyten und B-Zellen aus den Responder-PBMZ sollte erwogen werden, um den T-Zell-Anteil der Responder-PBMZ zu erhöhen.

Einschränkung der Interpretation der Werte

Die aufgelisteten methodischen Probleme innerhalb des verwendeten ELISpot-Assays führten zu einer eingeschränkten Relevanz einzelner Werte. Da jedoch alle Blut- und Gewebeproben gleich behandelt und alle Platten gleich ausgewertet wurden, waren Abweichungen vom „wahren“ Wert, wenn auch mitunter groß, zufällig und in beide Richtungen möglich. Diese zufälligen Abweichungen, auch in den negativen Zahlenbereich, heben sich statistisch gesehen auf, womit allgemeingültige Aussagen getroffen werden können. Die in dieser Studie so gefundenen biologischen Aussagen sind daher erstaunlich klar und lassen bei methodischer Verbesserung (siehe oben) noch aussagekräftigere Daten erwarten. Es ist zu beachten, dass p bei der Untersuchung von Korrelationen nur die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die untersuchte Patientenstichprobe aus einer Gesamtpopulation stammt, bei der zwischen den untersuchten Merkmalen überhaupt kein Zusammenhang besteht. Es bezieht sich dabei nicht auf den Korrelationskoeffizienten und macht keine Aussage über die Stärke des Zusammenhangs. In einer kleinen Stichprobe mit einer großen Varianz der Werte (wie im vorliegenden Fall) ist es daher wahrscheinlicher, einen starken Zusammenhang zu finden als einen schwachen. Das deutet darauf hin, dass in einer erneuten Studie an einer größeren Patientengruppe, in der ein verbessertes ELISpot-Assay verwendet würde, die in dieser Arbeit beschriebenen Zusammenhänge stärker hervorkämen und schwächere Zusammenhänge, die anhand dieser Patientenstichprobe nicht gefunden werden konnten, sichtbar würden.

Korrelationen wurden mit Hilfe des nichtparametrischen Spearman-Rho-Testes untersucht, der lediglich auf einen vorhandenen jedoch nicht auf einen linearen Zusammenhang testet und damit keine Aussagen zu einer prädiktiven Assoziation macht.

Obwohl die vorliegenden Ergebnisse ermutigend sind und die Werte der hohen Alloantworten prä-Tx schon jetzt große klinische Relevanz besaßen, kann der einzelne Patient nur Nutzen aus dem Verfahren ziehen, wenn es in Zukunft generell einen prädiktiven Wert bekommt. Vor Einsatz in einer klinischen Studie, die beispielsweise eine Therapieänderung oder die Durchführung einer Biopsie in Abhängigkeit der im ELISpot-Assay ermittelten Werte nach sich zöge, sollten die methodischen Probleme verringert werden, um eine höhere Reliabilität und ggf. klinische Relevanz zu erlangen.

7.2 Immunologische Interpretation

Allgemeine Interpretation der gemessenen Zellen

Zellen prä-Tx

Vor Transplantation gemessene spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen konnten nicht in Zusammenhang mit dem HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger gebracht werden. Sie können als präformierte Gedächtnis-T-Zellen interpretiert werden, die durch ein unbekanntes Antigen geprimt wurden und nach Transplantation mit dem fremden Gewebe kreuzreagierten. Der fehlende Zusammenhang zu Schwangerschaften, Transfusionen, vorherigen Transplantationen und CMV-Infektionen deutet womöglich auf die vielseitige Genese der Zellen in dieser kleinen untersuchten Patientengruppe hin. Andere Virus- und Bakterieninfektionen können eine Rolle spielen.

Humorale versus zelluläre Sensibilisierung

Obwohl Patienten, die humoral nicht sensibilisiert waren, das heißt, bei denen vor der Transplantation nie präformierten Antikörper gegen fremde HLA-Moleküle nachweisbar waren, im allgemeinen auch niedrigere Frequenzen spenderreaktiver Zellen aufwiesen, zeigte sich wie auch in der Arbeit von Heeger et al. [95], dass Patienten mit den höchsten Frequenzen spenderreaktiver Zellen unter Umständen keine präformierten Antikörper besaßen und Patienten mit dem größten gemessenen Prozentsatz an präformierten Antikörpern niedrige Frequenzen

spenderreaktiver Zellen vor der Transplantation zeigten. Die zelluläre Sensibilisierung gegen körperfremdes Gewebe scheint daher von der humoralen Sensibilisierung teilweise unabhängig.

Einfluss der zellulären Sensibilisierung

Alle fünf Patienten mit Werten von über 200 Spots prä-Tx erlitten eine frühe akute Rejektion, allerdings taten sie dies zu völlig unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlicher Schwere. Die Transplantatbeschaffenheit (Vorschäden, Peritransplantationsstress), die Einfluss auf die Antigenität des Transplantats hat, die Art der Immunsuppression (z.B. FTY720, siehe Patient 5 und Abschnitt 7.3) und eventuell eine zusätzliche humorale Sensibilisierung, wobei antikörpervermittelte Komplementreaktionen zu einer Gewebsschädigung und damit ebenfalls zu einer erhöhten Antigenität des Transplantats führen (siehe Patient 4 und 6 und Abschnitt 7.3), können womöglich die Auswirkung einer zellulären Sensibilisierung auf das Transplantat modifizieren.

Zellen post-Tx

Nach Transplantation konnte man im ELISpot-Assay sowohl überlebende präformierte Gedächtniszellen als auch aus naiven T-Zellen neu gegen den Spender geprimte Effektor-T-Zellen messen. Bei den Patienten 4, 5, 6 und 7 sank zwar die Anzahl der gemessenen spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen vom prä-Tx-Wert zum Wert des Tag 1 post-Tx, diese können aber immer noch als Gedächtniszellen gedeutet werden. Dass die Anzahl der gemessenen Zellen vor Transplantation mit der am Tag 1 post-Tx, in Woche 3 und der maximalen Anzahl post-Tx korrelierten, bezeugt den Anteil, den möglicherweise auch proliferierte Gedächtniszellen an den jeweiligen Messwerten post-Tx hatten. Dagegen ließen sich bei Patient 10, 11, 13 und 14 erst nach der Transplantation spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen nachweisen, die als neu geprimte Effektorzellen gedeutet werden können. Im Gegensatz zu den Gedächtniszellen prä-Tx korrelierte die Anzahl der gemessenen Zellen post-Tx mit dem HLA-Mismatch, besonders in Woche 2, was ebenfalls für die Generation neuer spenderreaktiver Effektorzellen spricht.

Eine mögliche durch längere Ischämiezeit bei Kadaverspenden entstandene Schädigung mit zugehöriger höherer Antigenität des Transplantats könnte eine Erklärung für die höheren maximalen Frequenzen spenderreaktiver Zellen post-Tx bei Patienten mit Kadaverspende im Vergleich zu Patienten mit einer Lebendspende sein.

Interessant war die Feststellung, dass Patienten mit den höchsten maximalen und mittleren Werten post-Tx jeweils mindestens 79 Monate hämodialysiert wurden. Nach klinischer Erfahrung haben Dialysepatienten neben der renalen Anämie und daher erhöhtem Transfusionsbedarf auch ein deutlich erhöhtes Infektionsrisiko, was zusammen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit immunologischer Sensibilisierungen bedeutet. Drei der Patienten wiesen tatsächlich auch höchste prä-Tx-Werte auf.

Subklinische Rejektion

Die Arbeitsgruppe um D. Rush untersuchte die Unterschiede zwischen klinischer und subklinischer Rejektion anhand von Aktivierungsmarkern in Nierentransplantatbiopsaten. Sie stellten eine Zunahme der Expression von inflammatorischen Markern in normalen Biopsien, über Biopsien mit subklinischen zu klinischen akuten Rejektionen für alle Zellen der lymphatischen und monozytären Reihe fest. Während jedoch keiner der anderen Marker zu einer Diskriminierung zwischen subklinischer und klinischer Rejektion beitrug, war der Aktivierungsmarker für Makrophagen AIF1 über zehnmal stärker in klinischen akuten Rejektionen exprimiert als in subklinischen Rejektionen. Das deutet darauf hin, dass die Einschränkung der Nierenfunktion durch eine klinische akute Rejektion zumindest zum Teil auf vasokonstriktische oder zytotoxische Substanzen zurückgeht, die von Makrophagen stammen [104].

In einer Untersuchung nierentransplantierter Patienten ohne klinische akute Rejektion durch Legendre et al. ging der Entwicklung einer CTN zwei Jahre post-Tx eine subklinische akute Rejektion, innerhalb der ersten drei Monate post-Tx voraus [105]. Zwei weitere Studien zeigten, dass subklinische Rejektionen zu einer Zunahme der Fibrosierung in Protokollbiopsien bei Kindern führten [106, 107]. Insofern liegt die Vermutung nahe, dass subklinische Rejektionen zu der Entstehung einer CTN beitragen.

Eine andere Beobachtung widerspricht dieser These nicht. Einige Autoren erbrachten Hinweise, dass sowohl für direkt wie auch indirekt geprimte Zellen die Frequenz der auftretenden T-Zellen entscheidend für das Organ ist, wobei es unter einer bestimmten Schwelle nicht zu einer akuten Rejektion, sondern zu einer geringfügigeren Schädigung des Organs kommen könnte, die allerdings in Fibrose und Vaskulopathie im Sinne einer CTN mündet [108, 109, 110, 111]. Man könnte daher vermuten, dass eine zu kleine Anzahl spenderreaktiver T-Zellen nicht ausreicht, um eine suffiziente DTH-Reaktion - zytotoxische T-Zellantwort und Makrophagenaktivität - zu generieren, und damit eine akute klinische Rejektion mit einer eingeschränkten Nierenfunktion

zu vermitteln. Stattdessen kommt es zu einer subklinischen Rejektion, die trotzdem die Bildung einer CTN begünstigt.

Serón et al berichteten, dass der Grad der interstitiellen Infiltration in Protokollbiopsien sechs Wochen post-Tx bei 35 nierentransplantierten Patienten mit stabiler Transplantatfunktion negativ mit der Nierenfunktion sechs Monate post-Tx korrelierte [112]. Da auch die Anzahl der in der vorliegenden Arbeit gemessenen spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen im Blut innerhalb der ersten drei Monate post-Tx mit der Nierenfunktion sechs Monate, aber auch ein Jahr post-Tx negativ assoziiert war, könnten die in dieser Arbeit gemessenen Zellen im Blut Korrelate der transplantatinfiltrierenden Zellen darstellen - möglicherweise vor Infiltration.

In diesem Falle würde die Messung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen im Blut als noninvasiver, früher Marker für subklinische und klinische akute Rejektionen fungieren, und damit auch als prognostischer Marker.

Direkte versus indirekte Präsentation

Eine Kernidee in der Transplantationsmedizin ist die Annahme, dass direkt geprimte T-Zellen vor allem akute Rejektion in der Frühphase nach Transplantation initiieren, während die spezifische Alloantwort nach Absterben der antigenpräsentierenden Zellen des Spenders später überwiegend mittels indirekt geprimter T-Zellen vermittelt wird. Der indirekte Weg der Präsentation wird daher auch mit einer chronischen Schädigung des Organs im Sinne einer CTN in Verbindung gebracht.

Experimente von Lechler et al. führten zu der Beobachtung, dass in Ratten durch die Depletion der Spenderleukozyten aus Nierentransplantaten ein permanentes Überleben der transplantierten Organe zu erreichen war. Die Injektion von dendritischen Zellen des Spenders hingegen führte zu einer abrupten akuten Rejektion des Organs [113, 114]. Daraus schlussfolgerte man, dass die dendritischen Zellen des Spenders T-Zellen des Empfängers über den direkten Präsentationsweg aktivierten, die eine akute Rejektion des Organs vermitteln. In diesem Model tragen direkt geprimte T-Zellen zu einer Tubulitis des Transplantats - durch direkte Erkennung der fremden Tubuluszellen - und zu einer Vaskulitis - durch direkte Erkennung der fremden Endothelzellen-, welche beide kennzeichnend für eine akute Rejektion sind, bei.

Da dieser Weg nur innerhalb der ersten paar Wochen nach Transplantation, solange dendritische Zellen des Spenders zur Verfügung stehen, beschritten werden kann, müsste nach dieser Zeit die indirekte Präsentation in den Vordergrund treten. Dies unterstützend beobachteten mehrere

Autoren eine spenderspezifische Hyporeagibilität für direkt geprimte CD4^{pos}- und CD8^{pos}-Zellen im Verlauf nach Nierentransplantation [115], die entweder durch Deletion oder Anergie der betreffenden Zellen verursacht sein könnte. Diese Beobachtung konnte man in Patienten mit einer CTN und in Patienten mit stabiler Transplantatfunktion gleichermaßen machen, weshalb vermutet wurde, dass direkt geprimte T-Zellen nicht Hauptakteure bei der Entstehung einer chronischen Rejektion sind. Andererseits beschrieben viele Studien eine erhöhte Frequenz alloreaktiver indirekt geprimter T-Zellen in Patienten mit chronischer Transplantatschädigung nach Herz-, Nieren- und Lungentransplantation [26, 68]. Indirekt geprimte T-Zellen können aber auch allein eine akute Rejektion auslösen, wie in Mausmodellen an Hauttransplantaten gezeigt wurde [116, 117], dazu kommt, dass sie in kleiner Population (1-5 % aller T-Zellen) schon nach 11 Tagen post-Tx in Lymphknoten nachgewiesen werden konnten [118].

Der Mechanismus, über den indirekt geprimte T-Zellen akute und chronische Rejektion vermitteln, ist nicht vollständig verstanden. Als mögliche Erklärungen werden die „Delayed Type Hypersensitivity“-Reaktion (DTH) und der Angriff auf eingewandertes Endothel des Empfängers ins Transplantat angeführt. Bei dem ersten werden indirekt geprimte CD4^{pos}-T-Zellen durch ins Transplantat eingewanderte Monozyten und Makrophagen, welche endozytierte Spenderantigen präsentieren, aktiviert und sezernieren Zytokine (z.B. IFN γ), die wiederum Makrophagen aktivieren zytotoxische Mediatoren wie Nitritoxid, freie Radikale, TNF α auszuschütten. Durch Bystander-Aktivierung können auch unspezifische T-Zellen mit einbezogen werden. Beim zweiten würden eingewanderte Endothelzellen des Empfängers, welche theoretisch Spenderantigen endozytieren und präsentieren könnten, ein direktes Ziel für indirekt geprimte CD8^{pos}-T-Zellen darstellen, wodurch es zu Gefäßschäden und ischämischer Zerstörung des Transplantats kommen könnte. He et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass CD8^{pos}-Zellen ein Hauttransplantat zerstören konnten, ohne dabei Antigen - präsentiert durch Hautzellen des Spenders - zu erkennen [119].

Die in dieser Arbeit gemessenen Zellen wurden wahrscheinlich sowohl durch den direkten Weg als auch durch den indirekten Weg geprimt. Theoretisch wurde im verwendeten ELISpot-Assay mit ganzen Zellen stimuliert. Da Zellen unter Kryokonservierung jedoch zerstört werden können, ist es nicht ausgeschlossen, dass sich unter dem Stimulationszellgemisch auch Zellfragmente befanden. Monozyten und B-Zellen des Empfängers könnten diese Zellfragmente phagozytiert und Spenderantigene präsentiert haben. Durch die direkte und indirekte Präsentation von Spenderantigen könnten direkt und indirekt geprimte T-Zellen aktiviert und zu einer IFN γ -Produktion animiert worden sein.

Auf der anderen Seite sprechen die Messzeitpunkte innerhalb der ersten drei Monate post-Tx für eine Dominanz der direkten Antwort. Die meisten der ermittelten Werte für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen liegen innerhalb der ersten vier Wochen post-Tx vor. Auch die meisten maximalen Werte wurden in diesem Zeitraum gemessen. In diesem Zeitraum wurden daher möglicherweise überwiegend direkt geprimte T-Zellen gemessen. Bereits innerhalb der ersten Woche nach Transplantation kommt es zu einer Migration der Spenderleukozyten aus dem Transplantat in die Empfängerlymphknoten und zur Aktivierung naiver T-Zellen durch direkte Präsentation mit anschließendem Ausschwärmen ins Blut. Nach klinischer Erfahrung erleiden nierentransplantierte Patienten in diesem Zeitraum die meisten akuten Rejektionen. Die Korrelation der Messwerte mit der Nierenfunktion ein Jahr post-Tx lässt sich damit eher auf eine Schädigung der Organe durch subklinische und klinische akute Rejektionen hervorgerufen durch direkt geprimte T-Zellen als durch eine chronische Schädigung durch indirekt geprimte T-Zellen erklären.

Für die Werte vor Transplantation bzw. zu einem späteren Zeitpunkt nach Transplantation ist ein höherer Anteil indirekt geprimter T-Zellen aber denkbar. Für weitere Studien zu späteren Messzeitpunkten, bei einem angenommenen Überwiegen der indirekt geprimten T-Zellen, könnte sich ein für die Messung indirekt geprimter T-Zellen modifizierter Ansatz als sinnvoller erweisen, z.B. durch Stimulation mit reinen Zellfragmenten von Spenderzellen [120] oder spenderspezifischen Peptiden [121].

T1/T2-Polarisation

IFN γ wurde in dieser Arbeit als Marker für Effektor- und Gedächtniszellen benutzt. Auf diese Weise konnten jedoch nicht alle spenderreaktiven T-Zellen bestimmt werden, da nicht alle aktivierten Spenderreaktiven Zellen IFN γ produzieren.

Dem Th1/Th2 Paradigma zufolge differenzieren T-Helferzellen nach Aktivierung in Abhängigkeit von bestimmten Zytokinen der Umgebung und der Bindung zur antigenpräsentierenden Zelle in Effektorzellen mit einem Th1-Muster, die vorrangig IL2, IFN γ und TNF α sezernieren und eine starke Makrophagenaktivität und zellvermittelte Immunität hervorrufen, oder mit einem Th2-Muster, die IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, and IL13 ausschütten, welches zu einer Hemmung der Makrophagenaktivität, einer starken Antikörperbildung durch B-Zellaktivierung (besonders IgG1 und IgE) und Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten führt. Eine Th1-Antwort des Immunsystems findet sich bei Virusinfektionen, intrazellulären Bakterien und Autoimmunkrankheiten wie z.B. Morbus Crohn. Wurm- und viele

Parasitenerkrankungen führen zu einer Th2-Antwort. Aber auch Allergiker und Atopiker leiden unter einer übermäßigen Th2-Antwortbereitschaft. Ein ähnliches Model besteht auch für CD8^{pos}-T-Zellen (Tc1/Tc2).

Lange Zeit nahm man an, dass ein Überwiegen von T1-polarisierten Zellen mit der akuten Rejektion eines Organs nach Transplantation assoziiert ist [82, 122, 123], während eine T2-basierende Immunantwort zur Entwicklung von Toleranz gegenüber dem Transplantat führt, welche mit einem langen Transplantatüberleben assoziiert ist [124]. Dafür spricht z.B. auch, dass der wirkungsvolle Anti-CD3-Antikörper OKT3, der erfolgreich gegen akute Rejektionen eingesetzt wird, zu einer T-Zell-Depletion vor allem T1-polarisierter Zellen im Blut führt [125]. In nierentransplantierten Mäusen unter Immunsuppression konnten Saggi et al. IFN γ -mRNA nur in Transplantaten mit akuter Rejektion nachweisen, während IL10 mRNA nur in tolerierten Transplantaten messbar war [126]. Trotzdem und im Gegensatz dazu konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Th1 Profil für eine Rejektion nicht unbedingt erforderlich ist und eine Th2-gesteuerte Immunantwort ebenfalls eine akute Rejektion hervorrufen kann und keinesfalls nur transplantatprotektiv wirkt [127]. Im Widerspruch zu der Arbeit von Saggi et al stellten einige Arbeitsgruppen sogar eine signifikante Beziehung zwischen einer akuten Rejektion und der Expression von IL10 im Transplantat fest [128]. In SCID Mäusen ohne funktionelle T- oder B-Zellen konnte sowohl mit der alleinigen Injektion von transplantatreaktiven Th1- als auch Th2-Zellen eine akute Rejektion eines Herztransplantates ausgelöst werden [129]. Ein ähnliches Experiment zeigte, dass auch Tc1-Zellen und Tc2-Zellen jeweils eine akute Rejektion verursachen können, wenn auch unter unterschiedlichem histologischen Bild [130]. Bei Th2-getriggerten Rejektionen ist z.B. eine Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten typisch [131]. In einigen Arbeiten scheint ein bestimmtes Verhältnis zwischen Th1 und Th2-Muster [132] oder aber auch ein Wechsel zwischen beiden relevant für das Auftreten einer akuten Rejektion zu sein [133].

In der vorliegenden Arbeit wurden daher möglicherweise nicht alle für das Transplantationsergebnis entscheidenden T-Zell-Subgruppen erfasst, da nur T1-polarisierte Zellen gemessen wurden. Trotzdem unterstützt diese Arbeit die Vorstellung, dass T1-polarisierte T-Zellen mit einer überwiegenden Sekretion von IFN γ einen wesentlichen Beitrag für die Pathologie von Nierentransplantaten in den ersten drei Monaten post-Tx leisten. Das steht in Übereinkunft mit Arbeiten von Heeger et al. und Hricik et al., die ebenfalls spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen in Nierentransplantierten prä-Tx bzw. post-Tx gemessen haben und eine Assoziation zum Auftreten akuter Rejektionen bzw. der Nierenfunktion nach sechs Monaten post-Tx feststellen konnten [95, 134]. Es ist außerdem

konsistent mit Arbeiten von van Besouw et al. [82], Segerer et al. [122] und D'Élios et al. [123], die in Herztransplantaten bzw. Nierentransplantaten eine prädominante Infiltration von T1-Zellen in Transplantatbiopsien während akuter Rejektionsepisoden beobachteten.

Möglicherweise würde eine zusätzliche Messung T2-polarisierter Zellen weitere diagnostische und prognostische Informationen liefern. Obwohl jedoch die Messung von IL4 und IL5 im ELISpot-Assay generell ebenso möglich ist, und IL4- und IL5-produzierende T-Zellen in PBMZ von Allergikern im ELISpot-Assay durchaus hohe Frequenzen aufweisen können [95, 132], konnten bisher im ELISpot-Assay nach Nierentransplantation keine spenderreaktiven, IL4-, IL5- oder IL10-produzierenden Zellen gemessen werden [102]. Inwieweit das nur eine Frage der Anzahl T2-polarisierter Zellen im peripheren Blut, oder aber eine Frage der Bedeutung dieser Zellen für das Transplantat innerhalb dieses frühen Zeitraums post-Tx ist, bleibt noch offen.

CD4^{pos}-/CD8^{pos}T-Zellen

Bei den in dieser Arbeit gemessenen Zellen kann es sich sowohl um CD4^{pos} als auch CD8^{pos} Effektor-T-Zellen handeln, da beide T-Zell-Subgruppen IFN γ produzieren können.

Mit der Methode der LDA können spenderreaktive T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen differenziert und quantifiziert werden. Eine Unterscheidung zwischen naiven Zellen und Effektorzellen wurde bisher aber meist nicht unternommen:

Van der Mast et al. fanden eine höhere Anzahl Helfer-Zellen im Blut vor der Transplantation bei Nierenpatienten, die später eine akute Rejektion ihres Organs erlebten [91] während van Hoffen et al. bei Herztransplantierten erhöhte Frequenzen von Th2-Zellen bei Patienten beobachteten, die später keine akute Rejektion erlitten [135]. Hu et al. beschrieben dagegen eine signifikant höhere Anzahl zytotoxischer T-Zellen im Blut bei Patienten vor Transplantation, die später ihr Herztransplantat abstießen [136]. Und Bouma et al. schließlich fanden in nichtsensibilisierten Nierentransplantationspatienten gar keinen Zusammenhang zwischen den Frequenzen von weder zytotoxischen T-Zellen noch Helfer-T-Zellen im peripheren Blut vor Transplantation und dem Auftreten einer akuten Rejektion oder der Langzeitfunktion des Transplantats [137].

Für die Messung von T-Zellen nach Transplantation stellten Ouwehand et al. einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg von schon geprimten zytotoxischen T-Zellen mit dem Auftreten einer akuten Rejektion fest [138]. Vaessen et al. hingegen beschrieben einen

signifikanten Anstieg von Helfer-T-Zellen im Blut während einer akuten Rejektion eines Herztransplantats [139]. Van Besouw et al. zeigten, dass man die Immunsuppression in nierentransplantierten Patienten mit niedrigen Frequenzen zytotoxischer T-Zellen im Gegensatz zu denen mit hohen Frequenzen risikofrei für eine akute Rejektion minimieren kann [140] und Herzog et al. beschrieben das Absinken der Frequenz zytotoxischer T-Zellen als Marker für eine gute Langzeitfunktion[141]. Andere Arbeiten wiederum beobachteten eine gute Funktion von Leber- und Herztransplantaten nach über einem Jahr trotz Anwesenheit hoher Frequenzen zytotoxischer T-Zellen im peripheren Blut [142, 143]. Während die meisten Studien keine klinische Relevanz für die Frequenz von Helfer-T-Zellen im Blut nach Transplantation feststellten, beschrieben Beik et al. eine bessere Langzeitfunktion und weniger akute Rejektionen in Nierentransplantierten, in denen die Frequenz von Helfer-T-Zellen im Blut im Verlauf nach Transplantation abnahm [144]. Die Messungen der meisten dieser Studien fanden allerdings nach drei Monaten post-Tx statt.

Anhand der Widersprüchlichkeit der genannten Studien kann man keine Aussagen über CD4^{pos}- bzw. CD8^{pos} Subgruppen der im ELISpot in dieser Arbeit gemessenen IFN γ -produzierenden Effektorzellen machen. Da jedoch die Anzahl der gemessenen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten post-Tx sowohl mit einem HLA-Klasse-I-Mismatch als auch mit einem HLA-Klasse-II-Mismatch korrelierten, scheinen post-Tx sowohl CD4^{pos}- wie auch CD8^{pos}-T-Zellen in dieser Studie erfasst worden zu sein.

Regulatorisches IFN γ ?

Obwohl in dieser Arbeit eine signifikant negative Assoziation zwischen erhöhten Frequenzen spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen und der Nierenfunktion sechs Monate und ein Jahr post-Tx gefunden wurde, wiesen drei Patienten (16, 17, 18) trotz Zellfrequenzen von über $100/3 \cdot 10^5$ PBMZ post-Tx nach einem Jahr eine gute Nierenfunktion auf, und erlitten nie eine akute Rejektion. Die Messzeitpunkte der ermittelten Werte lagen zwischen drei Wochen und sieben Monaten post-Tx. Welche Funktion die gemessenen Zellen gegenüber dem Transplantat der Patienten ausübten und welcher Mechanismus jeweils zugrunde lag, kann nur spekuliert werden:

Seit einigen Jahren wird zunehmend über die Bedeutung sogenannter regulatorischer T-Zellen diskutiert. Für viele T-Zell-Subpopulationen mit CD4^{pos}, CD8^{pos}, CD4^{neg}CD8^{neg} Phänotyp sowie für sogenannte natürliche Killer-T-Zellen wurde dabei ein regulatorischer Effekt in verschiedenen Situationen nach Transplantation, zum Teil über Zell-Zellkontakte zum Teil über

Zytokinsekretion vermittelt, beschrieben [145]. Neben der Sekretion von IL4, IL10 oder TGF β wurde bei CD4^{pos}CD25^{pos}, bei natürlichen Killer-T-Zellen und bei 4C8^{pos} T-Zellen auch IFN γ -Sekretion beobachtet [146]. Während zwar bisher in der überwiegenden Literatur IL10, TGF β und kostimulatorische Oberflächenmoleküle für die regulatorische Funktion in vitro von CD4^{pos}CD25^{pos}-T-Zellen verantwortlich gemacht wurden [147, 148], konnte in vivo gezeigt werden, dass im Gegenteil eine Immunregulation durch die genannten Zellen von einer erhöhten, antigenspezifischen Expression von IFN γ abhängt [149]. CD4^{pos}CD25^{pos} regulatorische T-Zellen können durch CD4^{pos}- oder CD8^{pos}-T-Zellen vermittelte akute Rejektionen verhindern und Transplantat-Toleranz auslösen [145, 147]. Sie kommen in naiven Empfängern vor, können aber auch induziert werden. Spenderspezifische Transfusionen in Kombination mit CD4-Antikörpern können spenderspezifische regulatorische CD4^{pos}CD25^{pos} T-Zellen generieren [147].

Neuere Studien verweisen mittlerweile auf nicht nur proinflammatorische sondern auch regulatorische Funktionen von IFN γ . Endogenes IFN γ scheint in einigen Autoimmunmodellen eine immunsuppressive Rolle zu spielen. In Mäusen mit experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) führte die Behandlung mit IFN γ -Antikörpern zu einer Verstärkung der Symptome und der Mortalität [150] und IFN γ - und IFN γ -Rezeptor-Knockout-Mäuse waren sensitiver bezüglich der Induktion von EAE gegenüber dem Wildtyp [151]. Besonders interessant sind jedoch die Beobachtungen, dass sich die Rejektionsraten von Herztransplantaten zwischen IFN γ -Knockout-Mäusen und Wildtypen nicht unterscheiden und dass in IFN γ -Knockout-Mäusen keine Transplantattoleranz induziert werden kann [151, 152]. Endogenes IFN γ scheint für das Langzeitüberleben von Transplantaten verantwortlich zu sein, welches unter der medikamentösen CD28- und CD40-Kostimulationsblockade von T-Zellen auftritt [151, 156]. Außerdem kann IFN γ Th2-vermittelte Rejektionen regulieren [131]. Obwohl die Sekretion von IFN γ unter bestimmten Umständen eine inflammatorische Th1-getriebene Immunantwort verkörpert, kann sie unter anderen einen immunsuppressiven Effekt vermitteln. Mögliche Mechanismen sind dabei Apoptoseinduktion und Proliferationsinhibition alloaktiver T-Zellen [151, 154, 155].

Obwohl sehr spekulativ, könnten die hohen Frequenzen spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen post-Tx von Patient 18, der vor Transplantation 20 Transfusionen bekam, oder von den Patienten 16 und 17, die perioperativ mit CD3-Antikörper OKT3 behandelt wurden, zum Teil auch regulatorische T-Zellen repräsentieren.

7.3 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen prä-Tx

Frühe akute Rejektionen

Die vorliegende Arbeit konnte die Ergebnisse von Heeger et al. [95] innerhalb einer weiteren Patientenpopulation bestätigen, dass Patienten, die bereits vor der Nierentransplantation im Blutkreislauf eine hohe Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen aufweisen, ein erhöhtes Risiko besitzen, ihr Transplantat abzustoßen. Dabei wurde mit einem Cut-Off von 200 IFN γ -produzierenden Zellen/ $3 \cdot 10^5$ PBMZ ein wesentlich höherer Wert bestimmt als von Heeger et al, bei denen bereits mehr als 50 IFN γ -produzierende Zellen/ $3 \cdot 10^5$ PBMZ vor der Transplantation prädiktiv für das Auftreten einer akuten Rejektion waren. (Die Unterschiede können auf die verschiedenen Patientengruppen sowie auf verschiedene Einstellungen bei der computergestützten Auswertung des ELISpot-Assays zurückgeführt werden). Eine sowohl zelluläre als auch zumindest historisch humorale Sensibilisierung von PRA 63 % bzw. 44 % (bei aktuellen PRA von 0 bzw 4 %) wie sie Patient 4 und 6 aufwiesen, könnte die Prognose des Transplantats besonders ungünstig beeinflussen. Beide Patienten erlebten in der ersten Woche post-Tx eine schwere vaskuläre Rejektion, die zu einer langfristigen Einschränkung der Nierenfunktion führte.

Die klinische Relevanz dieses Ergebnisses liegt auf der Hand: Einige Patienten mit dem Risiko, ein bestimmtes Organ akut abzustoßen, können mit Hilfe des ELISpot-Assays vor der Transplantation identifiziert werden. Besonders bei der Transplantation einer Lebendspende, die organisatorisch genügend Zeit für die Durchführung des ELISpot-Assays lässt, könnte das Organ durch ein „zellulären Crossmatch“ besser ausgewählt werden. Bei der Transplantation von Kadaverspenden, die aufgrund des in der Wartezeit resultierenden Ischämieschadens des Spenderorgans ein Abwarten des ELISpot-Ergebnisses nicht zulässt, könnte eine zelluläre Sensibilisierung jedoch immerhin noch am ersten oder zweiten Tag post-Tx erkannt werden. Zusätzlich könnten Patienten auf der Nierentransplantationswarteliste ähnlich wie nach präformierten HLA-Antikörpern auch nach HLA-spezifischen T-Zellen gescreent werden, wobei zur Stimulation statt Spenderzellen Zelllinien mit bestimmten HLA-Molekülen (direkte Präsentation) oder Peptide von HLA-Molekülen (indirekte Präsentation), wie von Najafian et al. beschrieben [121], eingesetzt werden könnten. Bestimmte HLA-Mismatch-Kombinationen, gegen die auf zellulärer Ebene eine Sensibilisierung vorliegt, könnten vermieden und Hochrisikopatienten, die nur auf zellulärer, aber nicht auf humoraler Ebene sensibilisiert sind,

sodass bei ihnen keine präformierten Antikörper detektierbar sind, erkannt werden. Nach den vorliegenden Daten ist die Identifizierung eines Patienten mit einer zellulären Sensibilisierung gegen das Spenderorgan mit dem ELISpot-Assay möglich. Zukünftige Studien, die das ELISpot-Assay mit der in der vorliegenden Studie erarbeiteten methodischen Verbesserung verwenden, müssen belegen, ob eine Anpassung der immunsuppressiven Therapie anhand von ELISpot-Messungen einen klinischen Benefit für die so behandelten Patienten darstellt.

Toleranzinduzierende Therapieschemata, die auf einer Blockade der kostimulatorischen Rezeptoren (CD28, CTLA-4, CD154) beruhen, sind möglicherweise bei sensibilisierten Patienten weniger erfolgreich, wie anhand von Tierexperimenten nahe gelegt wurde [157, 158]. Während nämlich ein Antigenkontakt einer spenderspezifischen naiven T-Zelle unter Blockade kostimulatorischer Rezeptoren zu einer Anergie der Zelle ohne Ausbildung einer entsprechenden Effektorfunktion und damit zu einer Toleranz gegenüber dem fremden Organ führt, so können Gedächtnis-T-Zellen weitgehend unabhängig von Kostimulation aktiviert werden und eine Effektorfunktion gegen das Transplantat erlangen. Für FTY720, dessen transplantatschützende Eigenschaften einer erniedrigten T-Zell-Frequenz im peripheren Blut zuzuschreiben ist, welche vor allem durch verstärktes Homing reifer T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten und Peyer'sche Plaques aber auch durch verminderte Emigration reifer T-Zellen aus dem Thymus sowie Apoptoseinduktion in T-Zellen erklärt wird [159, 160, 161], wurde ebenfalls eine geringere Wirkung auf Effektor-Gedächtniszellen beschrieben [162], die allerdings auch eine wesentlich schwächere Expression von Homing-Rezeptoren aufweisen. Das Beispiel des Patienten 5, der vor der Transplantation eine hohe Anzahl spenderreaktiver Zellen aufwies, mit FTY720 behandelt wurde und innerhalb der ersten Woche eine schwere akute Rejektion erlitt, die zum Verlust des Organs führte, weist darauf hin, dass auch der Einsatz von FTY720 bei zellulär sensibilisierten Patienten trotz der ausgeprägten T-Lymphozytopenie nicht erfolgreich ist.

Ein immuntherapeutisches Regime müsste bei sensibilisierten Patienten daher andere Ansätze verfolgen. Die selektive T-Zell-Depletion hat bereits eine wichtige Bedeutung für die bisherige Behandlung sensibilisierter Patienten (z.B. Charité: 2x2,5 mg OKT3 perioperativ, z.B. USA: polyklonaler Kaninchen anti-Thymozyten-Gobulin ATG [163]). Für den T-Zell-Antikörper OKT3 wurde ein besonders depletierender Effekt bezüglich schon geprimter T-Zellen dokumentiert [125] und eine vorübergehende CD8^{pos} T-Zell-Depletion konnte die in sensibilisierten Mäusen auftretenden durch alloreaktive CD8^{pos}-Gedächtniszellen vermittelten, CD154-Blockade-resistenten akuten Rejektionen verhindern [158]. Auch nichtdepletierende Verfahren wie die Blockade von CD4^{pos}-oder CD8^{pos}-T-Zellen durch CD4- bzw. CD8-

Antikörper erwiesen sich in Tiermodellen als wirkungsvoll, da sie in geprimten, alloreaktiven T-Zellen Toleranz gegenüber dem Transplantat hervorrufen konnten [163]. Neue vor kurzem beschriebene Kostimulationswege über die nur auf aktivierten T-Zellen exprimierten Oberflächenmoleküle ICOS, OX40 und PD-1 könnten, da anscheinend ohne Effekt auf naive T-Zellen in die Reaktivierung von Gedächtniszellen involviert, neue Ansatzpunkte für die Verhinderung der Reaktivierung alloreaktiver Gedächtniszellen geben [165].

Langzeitfunktion

Trotz der Vorhersagekraft des Assays für das Auftreten einer akuten Rejektion konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen vor der Transplantation und dem Zeitpunkt (zwischen einer Woche und 6 Monaten post-Tx) oder der Stärke (zwischen „borderline changes“ und Typ 3) der akuten Rejektionsepisoden gefunden werden. Obwohl das Auftreten von akuten Rejektionen einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer CTN darstellt und prognostisch ungünstig für die Langzeitfunktion des betroffenen Nierentransplantats ist, konnte weder in dieser Studie noch von Heeger et al. ein direkter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen vor der Transplantation und der Nierenfunktion in der Nachbeobachtungszeit (ein Jahr nach Transplantation GFR zwischen 63,5 ml/min/1,73m² und absoluten Funktionsverlust) gefunden werden. Im Gegensatz zu Heeger et al, in deren untersuchter Patientengruppe Patienten mit den niedrigsten Werten für IFN γ -produzierende Zellen prä-Tx rejektionsfrei blieben [95], erlitten 13 Patienten in dieser Studie auch ohne stark erhöhte Werte vor der Transplantation eine akute Rejektion. Eine Identifizierung der auf zellulärer Ebene sensibilisierten Patienten vor der Transplantation würde daher also nur eine kleine Gruppe von Patienten (hier ca. 10 %) mit erhöhtem Rejektionsrisiko anscheinend unabhängig von der jeweiligen Langzeitprognose erfassen. Eine Aufwand-Nutzen-Relation ist zu überdenken. In Zusammenhang mit immuntherapeutischen Studien und humoralen Sensibilisierungen erscheint der Einsatz des ELISpot-Assays sinnvoll.

Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen post-Tx

Frühe akute Rejektionen

In einer unabhängigen, methodisch ähnlichen Studie weisen Hricik et al. darauf hin, dass in ihrer Patientengruppe Patienten mit einer akuten Rejektionsepisode signifikant höhere mittlere spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellfrequenzen innerhalb der ersten sechs Monate post-Tx

aufwiesen als Patienten ohne Rejektionsepisode, und dass Patienten mit den niedrigsten mittleren Werten für spenderreaktive Zellen innerhalb dieses Zeitraums generell rejektionsfrei blieben [134]. Dies wird in der vorliegenden Arbeit nicht unterstützt. Obwohl zumindest bei einigen Patienten während einer nachgewiesenen akuten Rejektion des Transplantats ein Anstieg der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen im Blutkreislauf nachvollziehbar war (siehe Abschnitt 6.1), so konnte doch kein zwingender Zusammenhang zwischen erhöhten Werten für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen nach der Transplantation und dem Auftreten einer klinischen akuten Rejektion gezeigt werden. Das kann unter anderem die weiter oben aufgeführten methodischen aber auch logistische Gründe haben. Nicht immer war es möglich, vor oder während des Verdachts auf eine akute Rejektion auch ein ELISpot-Assay durchzuführen, vor allem, wenn die Rejektionsepisode außerhalb der Studienzeit, also nach drei Monaten post-Tx lag. Die gemessenen Zellen könnten jedoch auch wie weiter oben erläutert im Zusammenhang mit dem Auftreten einer subklinischen akuten Rejektion stehen. Eine für den nierentransplantierten Patienten daher weit wichtigere Frage ist die nach der Prognose für die Langzeitfunktion des Nierentransplantates.

Langzeitfunktion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Transplantationspatienten, deren Anzahl spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen im venösen Blut innerhalb der ersten drei Monate erhöht ist, ein Jahr nach Transplantation eine signifikant schlechtere Nierenfunktion aufwiesen als Patienten ohne spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen in diesem Zeitraum. Dieses Ergebnis konnte durch Hricik et al. anhand von Mittelwerten über einen Zeitraum von sechs Monaten post-Tx für die Nierenfunktion sechs Monate post-Tx bestätigt werden [134]. Mehrere Studien an einigen Tausend Nierentransplantierten haben außerdem gezeigt, dass die Nierenfunktion sechs Monate bzw. ein Jahr nach Transplantation stark mit der Langzeitfunktion der Nierentransplantate assoziiert ist [2]. Insofern scheint die zelluläre Immunisierung gegen das Transplantat wie im ELISpot-Assay messbar schon innerhalb der ersten drei Monate post-Tx entscheidenden Einfluss auf die Langzeitfunktion des Nierentransplantats zu haben. Ein Anstieg der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen ohne Funktionsverschlechterung des Organs könnte einen Hinweis auf eine ablaufende „subklinische“ akute Rejektion geben, die einigen Autoren zufolge ähnlich wie die „klinische“ akute Rejektion prognostisch schlecht für die Langzeitfunktion des Nierentransplantates ist [9, 105, 112]. In diesem Falle würde der Anstieg spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen bei einigen Patienten (siehe Abschnitt 6.1) innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation sowie die eingeschränkte Nierenfunktion ein Jahr post-Tx mit einer GFR von teilweise weniger als 40 ml/min/1,73m²,

ohne dass eine akute Rejektion nachgewiesen wurde, durch das Auftreten einer subklinischen Rejektion erklärbar sein.

Rush et al. konnten zeigen, dass Patienten, die innerhalb der ersten drei Monate post-Tx eine subklinische akute Rejektion erlitten, jedoch mit Kortikosteroiden therapiert wurden, signifikant weniger frühe und späte klinische akute Rejektionen durchmachten und nach zwei Jahren eine bessere Nierenfunktion hatten als Patienten, die im selben Zeitraum eine subklinische Rejektion erlebten, die nicht therapiert wurde [15]. Wenn also der Anstieg spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen im Blut Ausdruck verstärkter Immunaktivierung gegen das Transplantat ist, oder sogar ein Korrelat zu den von Rush et al. innerhalb der ersten drei Monate post-Tx gefundenen subklinischen akuten Rejektionen darstellt, so könnte eine veränderte Immunsuppression bzw. eine echte Therapie dieser subklinischen akuten Rejektion, die also im peripheren Blut messbar wäre, ebenfalls zu einer Verbesserung der Langzeitprognose des Transplantats beitragen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass der Zusammenhang zwischen der Anzahl spenderreaktiver Zellen und Nierenfunktion nur in Patienten beobachtet wurde, bei denen keine klinische akute Rejektion festgestellt wurde. Da die klinischen akuten Rejektionen therapiert wurden, wurde zumindest bei einem Teil eine chronische Schädigung des Transplantats verhindert, wodurch sich die Nierenfunktion erholen konnte.

Während maximaler und mittlerer Wert der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen als Zeichen einer möglichen starken bzw. dauerhaften Immunaktivierung gegen das Transplantat sehr anschaulich sind und signifikant mit der Nierenfunktion nach einem Jahr korrelieren, so sind sie doch für die Klinik von weniger großem Nutzen, da man für ihre Bestimmung normalerweise mehrere Werte über den gesamten Zeitraum benötigt und unter Umständen z.B. für den maximalen post-Tx-Wert den richtigen Zeitpunkt „verpasst“. Dagegen stellt die routinemäßige Erfassung der spenderreaktiven, IFN γ -produzierenden Zellen aus PBMZ aller Nierentransplantatierten zu einem oder mehreren Zeitpunkten zwischen Tag sieben und Tag 21 post-Tx ein weniger großes Problem dar. Da die Werte für spenderreaktive, IFN γ -produzierende Zellen in Woche 2 und noch mehr die Durchschnittswerte aus Woche 2 und 3 sehr gut, ja meistens sogar stärker mit der Nierenfunktion ein Jahr post-Tx korreliert sind, könnte das ELISpot-Assay zu diesem frühen Zeitpunkt mit der Messung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen einen wichtigen prognostischen Marker für die Langzeitfunktion des Nierentransplantats bestimmen und Patienten identifizieren, die ein erhöhtes Risiko haben, einen immunologisch vermittelten Transplantatschaden zu erleiden, den man durch eine angepasste immunsuppressive Therapie vielleicht verhindern könnte. Aber auch eine zukünftige generelle Anpassung an akquirierte Effektormechanismen des Immunsystems wäre in diesem

entscheidenden Zeitraum für alle Nierentransplantierten denkbar. Auf der anderen Seite könnte man bei Patienten, die nur geringe Frequenzen spenderreaktiver T-Zellen aufweisen, die Immunsuppression und damit die Nebenwirkungen dieser Medikamente reduzieren. So berichteten Van Besouw et al. beispielsweise, dass stabile nierentransplantierte Patienten, bei denen sich vor einer Umstellung der Immunsuppression von Ciclosporin auf entweder Azathioprin oder MMF mit zusätzlicher, langsamer Reduzierung der Dosis keine spenderspezifischen zytotoxischen T-Zellen im Blut nachweisen ließen, keine akuten Rejektionen des Transplantats erlebten. Außerdem wiesen Patienten ohne akute Rejektionen vor der Umstellung signifikant weniger zytotoxische T-Zellen im Blut auf als Patienten, die nach der Umstellung eine akute Rejektion erlebten [140].

8 Literaturverzeichnis

1. Valujskikh A, Heeger P. *Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for detection of alloreactive cytokine-reacting cells-detailed methods*. Graft. 4:195-201, 2001
2. First MR. *Renal function as a predictor of long-term graft survival in renal transplant patients*. Nephrol Dial Transplant. 18 Suppl 1:3-6, 2003
3. Frei U, Schober-Halstenberg HJ. *Nierenersatztherapie in Deutschland-Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2002/2003*. Quasi Niere gGmbH
4. Lutz J; Stangl M; Heemann U. *Nierentransplantation in Deutschland-2002*. Zentralbl Chir. 128(10):816-820, 2003
5. Jahresbericht Deutsche Stiftung Organtransplantation, Nierentransplantation. *Organtransplantation 2002*. In: Organspende und Transplantation in Deutschland 2002: 28-32
6. Tedesco-Silva H, Mourad G, Kahan BD et al. *FTY720, a novel immunomodulator: efficiency and safety results from the first phase 2A study in de novo renal transplantation*. Transplantation. 77(12):1826-1833, 2004
7. Kirk AD, Hale DA, Mannon RB et al. *Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H)*. Transplantation. 15;76(1):120-129, 2003
8. Cecka JM. *The UNOS renal transplant registry*. Clin Transpl. 1-18, 2001
9. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR et al. *Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients*. Transplantation. 57:208-211, 1994
10. d'Ardenne AJ, Dunnill MS, Thompson JF et al. *Cyclosporin and renal graft histology*. J Clin Pathol. 39:145-151, 1986
11. Morris PJ. *Renal transplantation*. In: Tilney NL, Strom TB, Paul LC, eds. Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects. Philadelphia: Lippincott-Raven. 567-75. 1996
12. Racusen LC, Solez K, Colvin B et al. *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology*. Kidney Int. 55(2):713-723, 1999
13. Cecka JM, Terasaki PI. *The UNOS Scientific Renal Transplant Registry*. Clin Transpl.:1-16, 1992
14. O'Rourke RW, Osorio RW, Freise CE et al. *Flow cytometry crossmatching as a predictor of acute rejection in sensitized recipients of cadaveric renal transplants*. Clin Transplant. 14(2):167-73, 2000

15. Rush DN, Nickerson P, Gough J et al. *Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: A randomized study.* J Am Soc Nephrol. 9:2129-2134, 1998
16. Halloran PF, Melk A, Barth C. *Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence.* J Am Soc Nephrol. 10:167-181, 1999
17. Gjertson DW. *A multi-factor analysis of kidney graft outcomes at one and five years posttransplantation: 1996 UNOS update.* In: Clinical Transplants 1996, edited by Cecka JM, Terasaki PI, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory. 343-360, 1997
18. Parmer MS, Kjellstrand CM, Solez K et al. *Glomerular endothelial cell detachment in paired cadaver kidney transplants: Evidence that some cadaver donors have pre-existing endothelial injury.* Clin Transplant. 8:120-127, 1994
19. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. *The Collaborative Transplant Study: Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure.* Kidney Int. 53:217-222, 1998
20. Modena FM, Hostetter TH, Salahudeen AK et al. *Progression of kidney disease in chronic renal transplant rejection.* Transplantation. 52:239 -244, 1991
21. Guijarro C, Massy ZA, Kasiske BL. *Clinical correlation between renal allograft failure and hyperlipidemia.* Kidney Int. 48:56-59, 1995
22. Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD et al. *The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2).* Transplantation. 57(6):857-859, 1994
23. van Saase CM, van der Woude FJ, Thorogood J et al. *The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection.* Transplantation 59:1280-1285, 1995
24. Opelz G. *Strength of HLA-A, HLA-B, and HLA-DR mismatches in relation to short- and long-term kidney graft survival. Collaborative Transplant Study.* Transpl Int. 5 Suppl 1:621-624, 1992
25. Susal C, Opelz G. *Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens.* Transplantation. 73: 1269-1273, 2002
26. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA et al. *Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: Implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy.* J of Immunol. 167:7199-7206, 2001
27. Abe M, Kawai T, Futatsuyama K et al. *Postoperative production of antidonor antibody and chronic rejection in renal transplantation.* Transplantation. 63: 1616-1619, 1997
28. Halloran PF, Homik J, Goes N et al. *The "injury response": A concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long term transplant outcomes.* Transplant Proc. 29:79 -81, 1997

29. Shoskes D, Parfrey NA, Halloran PF. *Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse*. Transplantation. 49:201-207, 1990
30. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E et al. *Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation*. Transplantation. 59: 962-968, 1995
31. Cosio FG, Pesavento TE et al. *Post-transplant diabetes mellitus: Increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years*. Kidney Int. 59: 732-7, 2001
32. Midtvedt K, Hartmann A. *Hypertension after kidney transplantation: Are treatment guidelines emerging?* Nephrol Dial Transplant. 17:1166-1169, 2002
33. Kobashigaba JA, Kasiske BL. *Hyperlipidemia in solid organ transplantation*. Transplantation. 63:331-338, 1997
34. Brattstrom C, Wilczek H, Tyden G et al. *Hyperlipidemia in renal transplants treated with sirolimus (rapamycin)*. Transplantation. 65:1272-1274, 1998
35. Hijazi F, Zand MS, Demme RA. *Long-term management of post-transplant anemia and erythrocytosis*. Graft. 4:307-315, 2001
36. Rodino MA, Shane E. *Osteoporosis after organ transplantation*. Am J Med. 104:459-69, 1998
37. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. *Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study*. Kidney Int. 53:217-222, 1998
38. Wissing KM, Abramokicz D, Broeders N et al. *Hypercholesterolemia is associated with increased kidney graft loss caused by rejection in male patients with previous acute rejection*. Transplantation. 70:464-472, 2000
39. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. Am J Kidney Dis. 32:113-119, 1998
40. Kasiske BL, Vazquez MA, Harmon WE et al. *Recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients*. American Society of Transplantation. J Am Soc Nephrol. 11:1-86, 2000
41. Penn I. *Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression*. Drug Saf. 23(2):101-13, 2000
42. Lutz J, Heemann U. *Tumours after kidney transplantation*. Curr Opin Urol. 13:105-9, 2003
43. Sheil A. *Patterns of malignancies following renal transplantation*. Transplant Proc. 31:1263-1265, 1999
44. Colleoni G, Oliveira J, Borducchi D et al. *Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after renal transplantation: management and evolution of seven cases among 1002 renal transplants in Sao Paolo, Brazil*. Leuk Lymphoma. 39:145150, 2000

45. Opelz G, Dohler B. *Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report.* Am J Transplant. 4(2):222-230, 2004
46. Sia IG, Paya CV. *Infectious complications following renal transplantation.* Renal Transplantation Surg Clin North Am. (1):95-112, 1998
47. Rubin RH, Tolkoff-Rubin NE. *Opportunistic infections in renal allograft recipients.* Transplant Proc. 20:12-8, 1988
48. Rubin RH. *Prevention of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients.* Transplant Infect Dis. 2(3):90-100, 2000
49. Isoniemi HM, Ahonen J, Tikkanen MJ et al. *Long-term consequences of different immunosuppressive regimens for renal allografts.* Transplantation. 55:494-499, 1993
50. Johnson RW, Kreis H, Oberbauer R et al. *Sirolimus allows early withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure.* Transplantation. 72:777-786, 2001
51. Ahsan N, Hricik D, Matas A et al. *Prednisone withdrawal in kidney transplant recipients on cyclosporine and mycophenolate Mofetil-A prospective randomised study.* Steroid Withdrawal Study Group. Transplantation. 68:1865-1874, 1999
52. Vincenti F. *Immunosuppression Minimization: Current and future trends in transplant immunosuppression.* Review. J Am Soc Nephrol. 14:1940-1948, 2003
53. Nickerson P, Jeffery J, Gough J et al. *Effect of Increasing Baseline on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study.* J Am Soc Nephrol. 10:1801-1805, 1999
54. Suthanthiran M, Strom TB. *Renal transplantation.* N Engl J Med. 331:365-376, 1994
55. Ortho Multicenter Transplant Study Group. *A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants.* N Engl J Med. 313:337, 1985
56. Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS. *Cellular and molecular Immunobiology.* 2nd edition, W.B. Saunders Company, 1994
57. McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharper AH. *The role of B7 costimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells.* Immunol Rev. 165:231-247, 1998
58. Rogers PR, Dubey C, Swain SL. *Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen.* J Immunol. 164: 2334-2346, 2000
59. Janeway CA; Travers P; Walport M et al. *The adaptive immune response.* In: Immunobiology. 5th ed. New York and London. Garland Publishing; 2001
60. Dubey C, Croft M, Swain SL. *Naive and effector CD4 T cells differ in their requirement*

- for T cell receptor versus costimulatory signals.* J Immunol. 157:3280-3289, 1996
61. Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C et al. *Response of naïve and memory CD8 T cells to antigen stimulation in vivo.* Nat Immunol. 1:47-53, 2000
 62. Sprent J, Surh C. *T cell memory.* Annu Rev Immunol. 20:551-579, 2002
 63. Epperson DE, Pober JS. *Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells.* J Immunol. 153:5402-5412, 1994
 64. Perez VL, Henault L, Lichtman AH. *Endothelial antigen presentation: stimulation of previously activated but not naïve TCR-transgenic mouse cells.* Cell Immunol. 189:31-40, 1998
 65. Hutchinson IV. *Cellular mechanisms of allograft rejection.* Curr Opin Immunol. 3:722-728, 1991
 66. Dorling A, Lechler RI. *The passenger leukocyte, dendritic cell and antigen presenting cell (APC)* , in Tilney NL, Strom TB, Leendert CP (editors). Transplantation biology - cellular and molecular aspects, Philadelphia, 1996
 67. Benichou G, Takisawa PA, Olson CA et al. *Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection.* J Exp Med. 175(1): 305-308, 1992
 68. Shoskes DA, Wood KJ. *Indirect presentation of MHC antigens in transplantation.* Immunol. today. 15: 32-38, 1994
 69. Hornick et al. *Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in patients with chronic cardiac allograft rejection.* Circulation. 101(20):2405-2410, 2000
 70. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B et al. *Indirect allorecognition of major histocompatibility complex alloptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction.* Transplantation. 64 (6): 795-800, 1997
 71. Liu Z, Colovai AI, Tugulea S et al. *Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection.* J Clin Invest. 198(5):1150-1157, 1996
 72. Ciubotariu R, Liu Z, Colovai AI et al. *Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts.* J Clin Invest. 101(2):398-405, 1998
 73. Lafferty KJ, Cunningham AJ. *A new analysis of allogeneic interactions.* Aust J Exp Biol Med Sci. 53(1):27-42, 1975
 74. Lowry RP. *DTH-induced tissue injury*, in: Tilney NL, Strom TB, Leendert CP (editors). Transplantation biology-cellular and molecular aspects, Philadelphia, 1996
 75. Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD et al. *Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat.* J Exp Med. 169: 931-946, 1989

-
76. Bolton EM, Armstrong HE, Briggs JD et al: *Cellular requirements for first-set renal allograft rejection*. Transplant Proc. 19:321-3, 1987
 77. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. *Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts*. J Immunol. 152(10):5120-5127, 1994
 78. Lipman ML, Stevens AC et al. *The strong correlation of cytotoxic T lymphocyte-specific serine protease gene transcripts with renal allograft rejection*. Transplantation. 53(1):73-79, 1992
 79. Bergese SD, Klenotic SM, Wakely ME et al. *Apoptosis in murine cardiac grafts*. Transplantation. 63 (2):320-325, 1997
 80. Ito H, Kasagi N, Shomori K et al. *Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling*. Transplantation. 60(8):794-798, 1995
 81. Moudgil A, Bagga A, Toyoda M et al. *Expression of gamma-IFN mRNA in bronchoalveolar lavage fluid correlates with early acute allograft rejection in lung transplant recipients*. Clin Transplant. 13(2):201-207, 1999
 82. van Besouw NM, Daane CR, Vaessen LM et al. *Different patterns in donor-specific production of T-helper 1 and 2 cytokines by cells infiltrating the rejecting cardiac allograft*. J Heart Lung Transplant. 14(5):816-23, 1995
 83. Nagano H, Mitchell RN, Taylor ML et al. *Interferon- deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts*. J. Clin. Invest. 100 (3):550-557, 1997
 84. Sprent J. *Lifespan of naïve, memory and effector lymphocytes*. Curr Opin Immunol. 5(3):433-438, 1993
 85. Brehm MA, Markees TG, Daniels KA et al. *Direct visualization of cross-reactive effector and memory allo-specific CD8 T cells generated in response to viral infections*. J Immunol. 170(8):4077-4086, 2003
 86. Pantenburg B, Heinzel F, Das L et al. *T cells primed by Leishmania major infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection*. J Immunol. 169(7):3686-93, 2002
 87. Burrows SR et al. *Cross-reactive memory T cells for Epstein-Barr virus augment the alloresponse to common human leukocyte antigens: degenerate recognition of major histocompatibility complex-bound peptide by T cells and its role in alloreactivity*. Eur J Immunol. 27(7):1726-1736, 1997
 88. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. *T cell memory*. Annu Rev Immunol. 16:201-223, 1998

89. Valujskikh A, Lakkis FG. *In remembrance of things past: memory T cells and transplant rejection*. Immunol Rev. 196: 65-74, 2003
90. Creemers P, Du Toit E, Cassidy MJ et al. *Sequential mixed lymphocyte culture after kidney transplantation: induction of tolerance or sensitization*. Nephron 75(2):166-70, 1997
91. Van der Mast BJ, van Besouw NM, de Kuiper P et al. *Pretransplant donor-specific helper T cell reactivity as a tool for tailoring the individual need for immunosuppression*. Transplantation. 72(5):873-80, 2001
92. Steinmann J, Kaden J, May G et al. *Failure of in vitro T cell assays to predict clinical outcome after human kidney transplantation*. J Clin Lab Anal. 8(3):157-162, 1994
93. Volk HD, Kern F. *Insights into the specificity and function of (allo)antigen-reactive T cells*. Am J Transplant. 1:109-114, 2001
94. Matesic D, Lehmann PV, Heeger PS. *High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice*. Transplantation. 65: 906-914, 1998
95. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S et al. *Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes*. J Immunol. 163: 2267-2275, 1999
96. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB et al. *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. Ann Intern Med. 130:461, 1999
97. Bradley L. *Migration and T-lymphocyte effector function*. Curr Opin in Immunol. 15:343-348, 2003
98. Smith G et al. *Measurement of cell-mediated immunity with a Varicella-Zoster Virus specific interferon-gamma ELISpot-assay: responses in elderly population receiving a booster immunization*. J Med Virol. 70:38-41, 2003
99. Asai T et al. *In vitro cytolytic T lymphocytes reactive against head and neck cancer recognize multiple epitopes presented by HLA-A2, including peptides derived from the p53 and MDM-2 proteins*. Cancer Immunol. 2:3, 2002
100. Pelfrey CM et al. *Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single-cell analysis of cytokine production*. J Immunol. 165:1641-1651, 2000
101. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. *Immunologic Monitoring*. Immunological Reviews. 196: 247-264, 2003

102. Gebauer BS, Hricik DE et al. *Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for posttransplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool.* Am J Transplant. 2(9):857-66, 2002
103. Galdiero M, Cipollaro de l'Ero G et al. *Effects of irradiation doses on alterations in cytokine release by monocytes and lymphocytes.* J Med. 25(1-2):23-40, 1994
104. Rush D. Winnipeg Transplant Group. *Insights into subclinical rejection.* Transplant Proc. 36(2):71-73, 2004
105. Legendre C, Thervet E, Skhiri H et al. *Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients.* Transplantation. 65: 1506, 1999
106. Shishido S, Asanuma H, Nakai H et al. *The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy.* J Am Soc Nephrol. 14: 1046, 2003
107. Birk PE, Stannard KM, Konrad HB et al. *Surveillance biopsies are superior to functional studies for the diagnosis of acute and chronic renal allograft pathology in children.* Pediatr Transplant. 8(1): 29-38, 2004
108. Heeger PS. *T cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update.* Am J Transplant. 3:525-533, 2003
109. Jones ND, Turvey SE, van Maurik A et al. *Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection.* J Immunol. 166(4):2824-2830, 2001
110. Honjo K, Xu Xy, Bucy RP. *Heterogeneity of T cell clones specific for a single indirect alloantigenic epitope (I-AB/H-2Kd54-68) that mediate transplant rejection.* Transplant. 70(10):1516-1524, 2000
111. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A et al. *CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II.* J Clin Invest 106 (8): 1003-1010, 2000
112. Serón D, Diaz-Gallo C, Grino JM et al. *Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function.* Transplant Proc. 23:1267, 1991
113. Lechler RI et al. *Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient.* J Exp Med. 156(6):1835-1841, 1982
114. Lechler RI, Batchelor JR. *Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells.* J Exp Med. 155(1): 31-41, 1982
115. Zanker B, Jooss-Rudiger J et al. *Evidence that functional deletion of donor-reactive T lymphocytes in kidney allograft recipients can occur at the level of cytotoxic T cells, IL-2-*

- producing T cells, or both. A limiting dilution study. Transplantation. 56(3): 628-32, 1993*
116. Braun MY, Grandjean I, Feunou P et al. *Acute rejection in the absence of cognate recognition of allograft by T cells. J Immunol. 166(8): 4879-4883, 2001*
117. Valujskikh A, Matesic D, Gilliam A et al. *T cells reactive to a single immunodominant self-restricted allopeptide induce skin graft rejection in mice. J Clin Invest 101(6):1398-1407, 1998*
118. Benichou G. *Direct and indirect recognition: the pathways to allograft immune rejection. Front Biosci. 4: 476-480, 1999*
119. He C, Heeger PS. *CD8 T cells can reject major histocompatibility complex class I-deficient skin allografts. Am J Transplant. (5):698-704, 2004*
120. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. *Contributions of direct and indirect T-cell alloreactivity during allograft rejection in mice. J Immunol. 162(1):352-358, 1999*
121. Najafian N et al. *Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. J Am Soc Nephrol.13:252-259, 2002*
122. Segerer S, Cui Y, Eitner F et al. *Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. Am J Kidney Dis. 37(3):518-31, 2001*
123. D'Ellos MM, Josien R, Manghetti M et al. *Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. Kidney Int. 51 (6):1876-1884, 1997*
124. Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R et al. *The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. Review, Curr Opin Immunol. 8:688, 1996*
125. Reinke P, Schwinzer H, Hoflich C et al. *Selective in vivo deletion of alloactivated TH1 cells by OKT3 monoclonal antibody in acute rejection. Immunol Lett. 57:151-153, 1997*
126. Saggi BH, Fisher RA, Naar JD et al. *Intragraft cytokine expression in tolerant rat renal allografts with rapamycin and cyclosporin immunosuppression. Clin Transplant. 13: 90-97, 1999*
127. Zelenika D, Adams E, Humm S et al. *The role of CD4+ cell subsets in determining transplantation rejection or tolerance. Immunol Rev. 182: 164-179, 2001*
128. Xu GP, Sharma VK, Li B et al. *Intragraft expression of IL10 messenger RNA: a novel correlate of renal allograft rejection. Kidney Int. 48 (5): 1504-1507, 1995*
129. VanBuskirk AM, Wakely ME, Orosz CG. *Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. Transplantation. 62(2):229-38, 1996*
130. Delfs MW, Furukawa Y, Mitchell RN et al. *CD8+ T cell subsets TC1 and TC2 cause different histopathologic forms of murine cardiac allograft rejection. Transplantation.*

- 71(5): 606-10, 2001
131. Braun MY, Desalle F, Le Moine A et al. *IL-5 and eosinophils mediate the rejection of fully histoincompatible vascularized cardiac allografts: regulatory role of alloreactive CD8(+) T lymphocytes and IFN-gamma*. Eur J Immunol. 30(5):1290-1296, 2000
 132. Tary-Lehmann M, Hricik DE, Justice AC et al. *Enzyme-linked immunosorbent assay spot detection of interferon-[gamma] and interleukin 5-producing cells as predictive marker for renal allograft failure*. Clin Transplant. 66(2):219-224, 1998
 133. Sadeghi M, Daniel V, Weimer R et al. *Pre-transplant Th1 and post-transplant Th2 cytokine patterns are associated with early acute rejection in renal transplant recipients*. Clinical Transplant. 17: 151-157, 2003
 134. Hricik D, Rodriguez V et al. *Enzyme linked Immunosorbent Spot (ELISpot) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients*. Am J Trans 3: 878-884, 2003
 135. Van Hoffen E, Polen E, Robertus-Teunissen M et al. *High frequency of IL4 producing helper T lymphocytes associated with a reduced incidence of heart allograft rejection*. Transpl Int. 13(1): 216-224, 2000
 136. Hu H, Robertus M, de Jonge N et al. *Reduction of donor-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in peripheral blood of allografted heart recipients*. Transplantation. 58(11):1263-8, 1994
 137. Bouma GJ, van der Meer-Prins EM et al. *Relevance of pretransplant donor-specific T cell allorepertoire for human kidney graft survival*. Transplantation. 59(7):969-76, 1995
 138. Ouwehand AJ, Baan CC, Roelen DL et al. *The detection of cytotoxic T cells with high-affinity receptors for donor antigens in the transplanted heart as a prognostic factor for graft rejection*. Transplantation. 56(5):1223-9, 1993
 139. Vaessen LM, Daane CR, Maat AP et al. *T helper frequencies in peripheral blood reflect donor-directed reactivity in the graft after clinical heart transplantation*. Clin Exp Immunol. 118(3):473-9, 1999
 140. van Besouw NM, van der Mast BJ, de Kuiper P et al. *Donor-specific Tcell reactivity identifies kidney transplant patients in whom immunosuppressive therapy can be safely reduced*. Transplantation. 70(1):136-43, 2000
 141. Herzog WR, Zanker B, Irschick E et al. *Selective reduction of donor-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in patients with a well-functioning kidney allograft*. Transplantation. 43(3):384-9, 1987
 142. Eberspacher ML, Otto G, Herfarth C et al. *Frequency analysis of donor-reactive cytotoxic T lymphocyte precursors in in allograft recipients. Lack of correlation with clinical*

- outcome*. Transplantation. 57(12):1746-52, 1994
143. Loonen L, Vaessen L, Balk A et al. *Long-term survival of heart grafts in the presence of donor-specific cytotoxic T-cell precursors (CTLp) in the peripheral blood*. Transpl Int. 7 Suppl 1:S 596-8, 1994
144. Beik A, Higgins RM et al. *Clinical significance of selective decline of donor-reactive, IL-2-producing T lymphocytes after renal transplantation*. Transplant Immunology. 5:89-96, 1997
145. Wood KJ, Sakaguchi S. *Regulatory T cells in transplantation tolerance*. Nat Rev Immunol. 3:199-209, 2003
146. Garin MI, Lechler RI. *Regulatory T cells*. Curr Opin Org Transplant. 8:7-12, 2003
147. Kingsley C.I., Karim M, Bushell AR et al. *CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses*. J Immunol. 168:1080-1086, 2002
148. Josien R, Douillard P, Guillot C et al. *A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance*. J Clin Invest. 102(11):1920-6, 1998
149. Sawitzki B, Kingsley CI, Karim M et al. *Interferon gamma production by regulatory T cells is prerequisite for their regulatory function in vivo*. Eingereicht zur Publikation.
150. Billiau A, Heremans H, Vandekerckhove F et al. *Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma*. J Immunol. 140:1506-1510, 1988
151. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C et al. *Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. J Immunol. 156(1):5-7, 1996
152. Saleem S, Konieczny BT, Lowry RP et al. *Acute rejection of vascularized heart allografts in the absence of IFN-gamma*. Transplantation. 62(12):1908-1911, 1996
153. Hassan AT, Dai Z, Konieczny BT et al. *Regulation of alloantigen-mediated T-cell proliferation by endogenous interferon-gamma: implications for long-term allograft acceptance*. Transplantation. 68:124-129, 1999
154. Dalton DK, Haynes L, Chu CQ et al. *Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells*. J. Exp. Med. 192:117-122, 2000
155. Badovinac V.P, Tvinnereim AR, Harty J T. *Regulation of antigen-specific CD8(+) T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma*. Science. 290:1354-1358, 2000
156. Konieczny BT, Dai Z, Elwood ET et al. *IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways*. J

- Immunol. 160:2059-2064, 1998
157. Valujskikh A, Pantenburg, Heeger PS. *Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice.* Am J Transplant. 2:501, 2002
158. Zhai Y, Meng L, Gao F et al. *Allograft rejection by primed/memory CD8(+) T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients.* J Immunol. 169:4667-4673, 2002
159. Brinkmann V, Pinschewer DD, Feng L et al. *FTY720: Altered lymphocyte traffic results in allograft protection.* Transplantation. 72:764-769, 2001
160. Yagi H, Kamba R, Chiba K et al. *Immunosuppressant FTY720 inhibits thymocyte emigration.* Eur J Immunol. 30: 1435-1444, 2000
161. Nagahara Y, Enosawa S et al. *Evidence that FTY720 induces T cell apoptosis in vivo.* Immunopharmacology. 48:75-85, 2000
162. Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B et al. *FTY720 immunosuppression impairs effector T-cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory.* J Immunol. 164:5761-5770, 2000
163. Brennan DC, Flavin K, Lowell JA et al. *A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients.* Transplantation. 67(7):1011-8, 1999
164. Cobbold SP, Martin G, Waldmann H. *The induction of skin graft tolerance in major histocompatibility complex-mismatched or primed recipients: primed T cells can be tolerized in the periphery with anti-CD4 and anti CD8 antibodies.* Eur J Immunol. 20:2747-2755, 1990
165. Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. *Alloreactive memory T cells in transplantation tolerance.* Curr Opin in Org Transpl. 8:13-18, 2003

9 Anhang

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei allen Patienten bedanken, die ihr Blut regelmäßig zur Verfügung gestellt haben, sowie bei allen Schwestern und Ärzten der Nierentransplantationsambulanz und der Stationen 13 und 46 des CVK, die an der logistischen Durchführung der Studie maßgeblich beteiligt waren. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des HLA-Labors des Instituts für Transfusionsmedizin des CVK für die schnelle und zuverlässige Bereitstellung von Spendermilzanteilen und die freundliche Hilfestellung bei der Zusammenstellung klinischer Daten.

Ohne die intensive Hilfe der Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Immunologie insbesondere von Gantuja Bold, Didier Bitti, Kristin Neuhaus und Christa Liebenthal, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders meinem Betreuer Peter Nickel bin ich zu großem Dank verpflichtet, da er mit großem Engagement und viel Geduld jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Prof. Petra Reinke und Herrn Prof. Hans-Dieter Volk danke ich für die Überlassung des Themas, die stetige Unterstützung, die interessanten Diskussionen und hilfreichen Anregungen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Allen Doktoranden- und Diplomanden-Kollegen danke ich für die schöne Zeit, die wir zusammen im Labor hatten. Meiner Familie und meinen Freunden danke ich sehr für ihr Interesse und ihre Geduld.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Franziska Presber, an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen vor und nach Nierentransplantation im ELISpot-Assay - Zusammenhang zu frühen akuten Rejektionen und zum klinischen Ausgang“ von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Franziska Presber

Lebenslauf

Persönliche Daten

- Name: Franziska Presber
- Geburt: am 28. 01. 1979 in Berlin
- Nationalität: deutsch

Schul-/Hochschulausbildung

- 09/ 85 08/ 91 Polytechnische Oberschule „Gerhardt Eisler“, Berlin
- 08/ 91 - 06/ 98 3. Gymnasium Berlin Friedrichshain „Heinrich Hertz“
- 08/ 95 - 06/ 96 Van Buren Highschool, Van Buren, Arkansas, USA
- 10/ 98 - 09/ 04 Medizinstudium an der Humboldt Universität zu Berlin

Praktische Tätigkeiten

Sozialpraktika

- 07/ 97; 07/ 98 ehrenamtliche Betreuerin in einem Integrationsferienlager des ABB
08/ 99 e.V. in Joachimsthal, Brandenburg, Deutschland

Krankenpflegepraktika

- 03 - 04/ 99 Krankenhaus Prenzlauerberg, Berlin, Chirurgie,
- 03 - 04/ 00 Krankenhaus im Friedrichshain, Berlin, Nephrologie

Famulaturen

- 03/ 01 Schlosspark-Klinik Berlin, Abt. Innere Medizin
- 02 - 03/ 03 Charité Berlin, Klinik für Dermatologie, Vener. und Allerg.
- 08 - 10/ 03 Praxis für Kinder und Jugendmedizin, Berlin

Forschungsjahr

- 10/ 01 - 09/ 02 Institut für Medizinische Immunologie der Charité